

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**Modelos Genéticos de Desregulación del Ciclo
Celular: Implicaciones en Cáncer**

TESIS DOCTORAL

ESTHER RODRÍGUEZ DÍEZ

MADRID, 2009

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Modelos Genéticos de Desregulación del Ciclo
Celular: Implicaciones en Cáncer**

ESTHER RODRÍGUEZ DÍEZ – LICENCIADA EN BIOLOGÍA

DIRECTOR: MARCOS MALUMBRES

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS
(CNIO), MADRID

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN:

El conocimiento molecular del fenómeno de proliferación celular y la identificación de las alteraciones moleculares en los reguladores básicos de la misma, nos abre un campo de estudio del cáncer humano, ya que la desregulación del ciclo celular parece ser un mecanismo universal que facilita la capacidad proliferativa de las células tumorales.

Dos transiciones fundamentales para la activación de la proliferación celular, son las transiciones entre las fases G1 y S (G1/S), en la cual se generan las proteínas necesarias para la replicación del genoma, y la transición G2/M, donde se regula la entrada en mitosis y segregación de los cromosomas. Los fallos en estos mecanismos reguladores están asociados con cáncer. Por ello, este trabajo se basa en la generación y caracterización de modelos animales modificados genéticamente para producir modelos adecuados al cáncer humano. En concreto, en la regulación de la progresión de la fase G1 para la entrada en la fase S de replicación del DNA, mediante la generación de ratones *Knock in* (KI) de Cdk6 para producir proteínas kinasas resistentes a sus inhibidores. En segundo lugar, hemos analizado uno de los reguladores implicados en la correcta formación del huso mitótico y de las divisiones asimétricas, NuMA1, mediante la generación de un ratón condicional para un alelo nulo de este gen que expresa a su vez un marcador de color.

SUMMARY:

Cell cycle deregulation is a common alteration in human cancer. Tumour cells accumulate mutations that result in constitutive mitogenic signaling and defective responses to anti-mitogenic signals that contribute to unscheduled cell proliferation.

Two fundamental regulatory steps during cell cycle progression are the G1/S transition, required to synthesize S-phase genes and replicate the genome, and the G2/M transition, where cells evaluate the proper entry into M-phase and chromosome segregation. Alterations in these regulatory pathways are associated with cancer. We have generated and characterized specific genetically modified mouse models for G1/S or G2/M regulators. First, we have characterized the effect of a Cdk6 knock in allele that contains a mutation resistant to the INK4 inhibitors. In particular, we have analyzed progression through G1/S and the role of Cdk6 in the haematopoietic system. Second, we have characterized the effect of a conditional gene trap allele for NuMA1, a critical regulator of microtubule function and the mitotic spindle, and the consequences of ablating this gene *in vivo*.

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	15
ÍNDICE	17
ABREVIATURAS.....	21
1. INTRODUCCIÓN.....	25
1.1 Ciclo celular y cáncer	27
1.2. Ciclo celular en mamíferos. Puntos de control.....	28
1.3. Fases G1 y S.....	29
1.3.1. CDKs y ciclinas	29
1.3.2. Inhibidores	32
1.4. Fases G2 y M.....	38
1.4.1. Punto de control mitótico.....	40
1.4.2. Estructura del huso, dinámica y regulación.....	42
1.4.3. Orientación del huso mitótico en las divisiones asimétricas.	43
2. OBJETIVOS.....	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.1. Ratones modificados genéticamente.....	53
3.1.1. <i>In vitro</i> : MEFs.....	54
3.1.2 <i>In vivo</i> : Ratones	55
3.2. Cultivos celulares	55
3.3. Análisis poblaciones hematopoyéticas.	56
3.4. Análisis histológico / molecular	59
3.5. Análisis ADN / ARN	61
3.6. Análisis molecular a nivel de proteína.....	63
4. RESULTADOS.....	65
4.1. Generación de ratones Cdk6 R31C.....	67
4.2. Hematopoyesis en ratones Cdk6 R31C.....	70
4.2.1. Timo y bazo en ratones jóvenes.	75
4.2.2. Timo y bazo en ratones adultos	76
4.3. Análisis en ratones dobles <i>knock in</i> : Cdk4R24C; Cdk6R31C	78
4.5. Generación de ratones condicionales para la deficiencia de NuMA.....	81

4.5. Efectos de la deficiencia de NuMA en desarrollo embrionario y regulación del ciclo celular.	87
4.6. Efectos causados por la delección de NuMA en animales adultos.	92
4.6.1. Piel.....	93
4.6.2. Sistema nervioso	95
5. DISCUSIÓN	101
5.1. Cdks, inhibidores INK4 y el control de G1/S	103
5.2. Control del huso mitótico por NuMA y su relevancia <i>in vivo</i>	109
6. CONCLUSIONES.....	115
7. BIBLIOGRAFÍA	119
ANEXO.....	139

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ADN/DNA: **Á**cido **D**esoxiribonucleico/ ***Desoxi ribonucleic Acid***

ADNc/cDNA: **Á**cido **D**esoxiribonucleico **c**omplementario / **C**omplementary ***Desoxi ribonucleic Acid***

ARN/RNA: **Á**cido ribonucleico/ ***Ribonucleic Acid***

ARNm: **Á**cido **R**ibonucleico **m**ensajero

BrdU: **B**romodeoxiuridina

BSA: ***B**ovine **S**erum **A**lbumin* (albúmina de suero bovino)

CD4: ***C**luster of **D**ifferentiation **4*** (conglomerado de diferenciación 4)

CD8: ***C**luster of **D**ifferentiation **8*** (conglomerado de diferenciación 8)

Células ES: Células madre embrionarias (**E**mbrionic **S**tem **C**ells)

CNIO: **C**entro **N**acional de **I**nvestigaciones **O**ncológicas

Cy3: indocarbocyanina

Cy5: indodicarbocyanina

DMEM: ***D**ulbecco's **M**odified **E**agle's **M**edium*

EDTA: ***E**thylenediaminetetraacetic **A**cid* (ácido etilendiaminotetraacético)

ER: ***E**strogen **r**eceptor* (receptor de estrógenos)

FBS: ***F**etal **B**ovine **S**erum* (suero fetal bovino)

FITC: Isocianato de fluoresceína

GFP: ***G**reen **F**lourescence **P**rotein* (proteína verde fluorescente)

Ig: Inmunoglobulina

KDa: KiloDalton

KO: Animales o células derivadas de cepas deficientes en un gen (***k**nock-**o**ut*)

KI: Animales o células derivadas de cepas con mutación en un gen (***k**nock-**i**n*)

MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón (***M**ouse **E**mbrionic **F**ibroblasts*)

NEO: Neomicina

mg: miligramos

mM: miliMolar

nt: nucleótidos

Abreviaturas

pb: pares de bases

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (tampón fosfato salino)

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

pRb: proteína del retinoblastoma

rpm: revoluciones por minuto

RH: Recombinación Homóloga

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR: *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

SDS: *Sodium Dodecyl Sulphate* (dodecil sulfato sódico)

TE: Tris-EDTA

Tg: Animales o células derivadas del animal transgénico

TK: Timidina quinasa

UAM: Universidad Autónoma de Madrid

UTR: *Untranslated region* (región no codificante)

WT: Animales o células derivadas de cepas silvestres (*Wild Type*)

4OHT: 4 hidroxí-tamoxifeno

1 . INTRODUCCIÓN

1.1 Ciclo celular y cáncer

El desarrollo del cáncer es un proceso análogo al proceso evolutivo. Se caracteriza por la producción de una sucesión de cambios genéticos, los cuales confieren de una u otra manera algún tipo de ventaja selectiva. El resultado de esto es la transformación progresiva de células normales a células tumorales, es decir, con crecimiento aberrante y con nuevas características adquiridas debido al proceso mutagénico (Foulds, 1954; Nowell, 1976).

Debido a la existencia de múltiples tipos y subtipos de cánceres, y la diversidad de tejidos en los que se pueden encontrar, todavía no está claro cuáles son las rutas moleculares que están alteradas para generar una célula tumoral o si estas rutas son las mismas en todos los tipos de tumores. Se han intentado resumir cuáles son las alteraciones fisiológicas comunes que pueden llevar al proceso tumoral, se pueden clasificar en seis, de las cuales es importante destacar la presencia de un ilimitado potencial replicativo que poseen dichas células, ya que son autosuficientes en las señales de crecimiento e insensibles a las señales antimitogénicas, y por otro lado son capaces de evadir la muerte celular programada o apoptosis. A todo esto hay que añadir la habilidad de las células tumorales para evitar los controles internos que limitan el potencial de replicación del material genético y la capacidad que poseen para formar nuevos vasos sanguíneos y para invadir nuevos tejidos (Hanahan and Weinberg, 2000)

Teniendo en cuenta todas las características necesarias para proporcionar un potencial maligno, cabe destacar la importancia que posee la desregulación del ciclo celular para el desarrollo tumoral. Muy frecuentemente, esta característica se obtiene gracias a la presencia de uno o más defectos en el control de la maquinaria que controla el ciclo celular; es decir, gracias a la alteración de los procesos que conducen a la replicación del ADN y la división celular y sus controles.

Como ya se ha mencionado, las células tumorales acumulan mutaciones que conllevan a una proliferación descontrolada y además, la mayoría de los tumores adquieren inestabilidad cromosómica y genómica que dan lugar a cambios en el número de cromosomas o mutaciones adicionales. Estas alteraciones, no solo se traducen en una ventaja proliferativa, también se produce un aumento en la susceptibilidad a acumular alteraciones genéticas adicionales, que contribuyen a la progresión tumoral y a la adquisición de fenotipos más agresivos

Por lo tanto, podemos concluir que el concepto de cáncer como una enfermedad del ciclo celular más bien considera la desregulación del ciclo celular como un paso esencial en el proceso de múltiples alteraciones hacia la génesis del tumor.

1.2. Ciclo celular en mamíferos. Puntos de control.

El ciclo celular de las células eucariotas consiste en la progresión ordenada de la célula por las distintas etapas que culminan en la división celular (Norbury and Nurse, 1992). Básicamente, esta progresión ha de asegurar la replicación del material genético, lo cual ocurre en la fase S (síntesis del DNA) y segregar este material y dividir el citoplasma en las dos células hijas (fase M o mitosis). La etapa de preparación para la fase S se conoce como G1 (*gap 1*), mientras que la interfase entre las fases S y M se conoce como G2 (*gap 2*). En mamíferos, la mayor parte de las células de un adulto están en una fase de quiescencia y por tanto no llevan a cabo ningún proceso del ciclo celular a no ser que alguna señal específica les obligue a ello. Por analogía, se dice que las células quiescentes que se encuentran fuera del programa de división celular se encuentran en G0 o fase de reposo (Figura 1)...

Para que una célula en reposo (G0) o una célula que acaba de finalizar la mitosis comience los procesos que determinan la división celular, se han de cumplir unos requisitos que aseguren la conveniencia de tal división. Entre ellos, las células deben asegurarse de haber sufrido una división anterior adecuada y de estar sometidas a señales mitogénicas externas que indiquen la necesidad de esa división para el tejido. Estas premisas llevan al comienzo del ciclo celular y son evaluadas durante la etapa temprana de la fase G1. De hecho, el análisis de la dependencia en factores de crecimiento de las células en cultivo llevó a la definición del “punto de restricción” como aquel punto en G1 donde las células ya no son dependientes de los factores de crecimiento (Pardee, 1974). Es decir, un punto de no retorno en G1 en el que las células ya se han comprometido a entrar en

fase S y comenzar la síntesis del DNA. La duplicación del genoma es un proceso que requiere una gran cantidad de material y de energía y resulta en células tetraploides. No es sorprendente, por tanto, que una vez que las células han duplicado su genoma estén comprometidas a la división celular con independencia de factores externos. Si alguna catástrofe celular afecta el desarrollo de la replicación del DNA o alguna fase posterior del ciclo celular, el control de la progresión a través del ciclo celular recae en diversos puntos de control (*checkpoints*) localizados en diversas fases (Hartwell and Weinert, 1989).

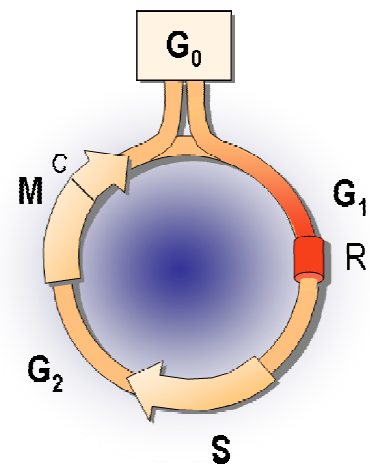


Figura 1: Fases del ciclo celular en mamíferos. R: punto de restricción; C: punto de control

Para evitar estos problemas y antes de entrar en fase S, las células se tienen que asegurar de que las condiciones ambientales son adecuadas para la división celular. Esta decisión recae en un grupo de procesos y reguladores que integran la información mitogénica y regulan la transición G1/S. Si la regulación de estos controladores está alterada no es difícil pensar que las células pueden comprometerse a la división celular en las condiciones no adecuadas y cooperar al desarrollo tumoral. Por otro lado, el mantenimiento de la integridad genómica es un evento crítico para prevenir una amplia variedad de efectos celulares, tales como la apoptosis, procesos de senescencia y transformación maligna (Draviam et al., 2004; Rajagopalan and Lengauer, 2004; Sanchez et al., 1996) y la correcta segregación de los cromosomas es esencial para el mantenimiento de un genoma intacto. Este proceso ocurre en mitosis, en esta fase del ciclo celular existe un punto de control, aunque el mecanismo completo aun no se conoce con claridad. Una de las propiedades comunes del cáncer, es la alteración en el número de cromosomas o aneuploidía. Para evitar que se produzca, es necesaria una correcta organización y dinámica del huso acromático o mitótico, esta estructura dinámica, formada por microtúbulos que se extienden de un polo a otro de la célula en división, proporciona la base para una correcta segregación cromosómica (Kline-Smith and Walczak, 2004).

1.3. Fases G1 y S

1.3.1. CDKs y ciclinas

Las quinasas dependientes de ciclina (Cdks), son proteínas quinasas heterodiméricas, compuestas por una subunidad catalítica, conocida como Cdk y una subunidad reguladora, conocida como ciclina. La regulación del ciclo celular está bien establecida gracias a estudios realizados en levaduras. En estos organismos, la progresión del ciclo celular está controlada por una sola Cdk, conocida como Cdc28 en *Saccharomyces cerevisiae* y Cdc2 en *Schizosaccharomyces pombe*, la cual se une a ciclinas específicas de las distintas fases del ciclo celular. El número de Cdks y de ciclinas se ha incrementado con la evolución, aunque sólo ciertos complejos Cdk-ciclina son los que se piensa que controlan la progresión del ciclo celular. En el genoma de los mamíferos, existen doce *loci* que codifican para Cdks, pero sólo cinco de ellas, Cdk1, Cdk2, Cdk3, Cdk4 y Cdk6 están implicadas directamente en la progresión del ciclo celular (Malumbres y Barbacid, 2005)

Según el modelo “clásico” de ciclo celular de mamíferos, los complejos específicos CDK-ciclina son responsables de la progresión de los eventos que tienen lugar durante interfase de una forma ordenada y secuencial. Las señales mitogénicas

son detectadas en primer lugar por la expresión de las ciclinas de tipo D (D1, D2 y D3), las cuales se unen y activan Cdk4 y Cdk6 durante G₁, la fase del ciclo celular en el que la célula se prepara para iniciar la replicación del ADN. La activación de este complejo lleva a la activación parcial de las proteínas de la familia pRB para permitir la expresión de las ciclinas de tipo E (E1 y E2), las cuales a su vez se unen y activan Cdk2 (Harbour et al., 1999). Los complejos Cdk2-ciclina E terminan de fosforilar a las proteínas de la familia pRB, produciendo su completa inactivación (Lundberg and Weinberg, 1998) (Figura 3). Cdk2 es de nuevo activado por la ciclina A2 al final de la fase S, para la progresión hasta la fase G₂. Finalmente, Cdk1 es activado por ciclinas de tipo A, al final de G₂, para facilitar el inicio de la mitosis. Una vez que se ha producido el desensamblaje de la membrana nuclear, las ciclinas A son degradadas, esto facilita la formación del complejo CDK1-ciclina B, responsable de la progresión de las células a través de la fase M.

Se han realizado estudios en ratones que nos demuestran que Cdk2, Cdk4 y Cdk6 no son esenciales para el ciclo celular en la mayoría de los tipos celulares, aunque la pérdida de cada una provoque un defecto en el desarrollo de tipos celulares especializados. Por ejemplo, Cdk4 es esencial para la proliferación de las células β del páncreas y las células lactotróficas de la hipófisis durante el desarrollo postnatal (Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999). Por otro lado, la pérdida de Cdk6 causa problemas hematopoyéticos, en concreto, defectos en la serie eritroide (Malumbres et al., 2004). Solo en el caso de la eliminación de Cdk1 se ha visto un arresto en el ciclo celular, y por lo tanto, causando letalidad embrionaria (Santamaria et al., 2007) (Tabla 1).

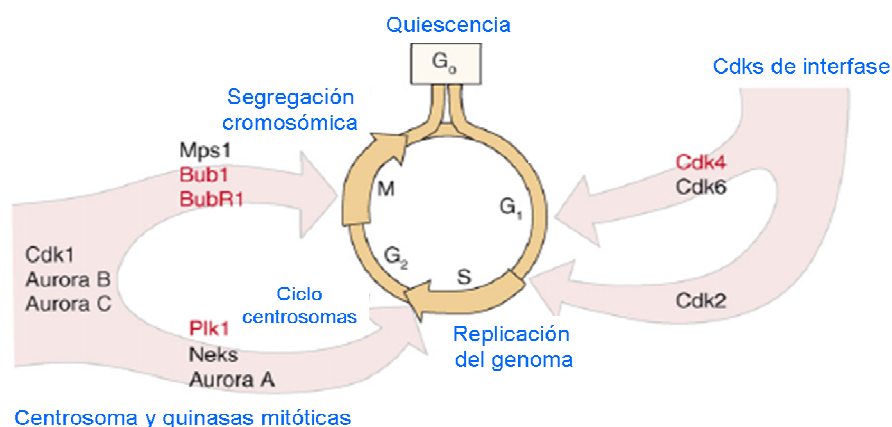


Figura 2: Principales quinasas del ciclo celular y su papel en la progresión del mismo. En rojo se muestran las quinasas que están mutadas en algunos tipos de cánceres humanos (modificado de Malumbres y Barbacid, 2007)

Tabla 1: Modelos de ratón de Cdk

Quinasa	Genotipo	Fenotipo	Referencia
<i>Pérdida de función</i>			
CDK1	Cdk1 ^{mut/mut}	Letalidad embrionaria en las primeras divisiones	(Santamaria et al. 2007)
CDK2	Cdk2 ^{-/-}	Esterilidad debido a defectos en meiosis	(Ortega et al. 2003; Berthet et al. 2003)
CDK4	Cdk4 ^{-/-}	Diabetes y problemas postnatales de proliferación de algunas células endocrinas	(Rane et al. 1999; Tsutsui et al. 1999; Martin et al. 2003; Mettus 2003; Jirawatnotai et al. 2004; Moons et al. 2002)
CDK6	Cdk6 ^{-/-}	Anemia y defectos en proliferación de algunas células hemtopoyéticas	(Malumbres, Sotillo et al. 2004)
CDK2; CDK6	Cdk2 ^{-/-} ; Cdk6 ^{-/-}	Viable. Genotipo idéntico al de los mutantes simples	(Malumbres et al., 2004)
CDK4; CDK6	Cdk4 ^{-/-} ; Cdk6 ^{-/-}	Letal embrionario tardío. Defectos en proliferación de precursores hematopoyéticos, especialmente de la línea eritroide	(Malumbres et al., 2004)
CDK2; CDK4; CDK6	CDK2 ^{-/-} ; CDK4 ^{-/-} ; CDK6 ^{-/-}	Letalidad embrionaria en mitad de la gestación, debido a problemas hematopoyéticos	(Santamaria et al. 2007)
<i>Ganancia de función</i>			
CDK4	Cdk4 ^{R24C/R24C*}	Diversos tipos de tumores con penetrancia completa	(Sotillo, Dubus et al. 2001)

Las quinasa mitóticas, tienen también una gran relevancia en el ciclo celular, ya que controlan, entre otras cosas, que la segregación cromosómica se produzca de forma correcta, evitando, como ya hemos comentado, la aparición de aneuploidías. Entre estas quinasas, además de Cdk1 existen otras como Plk1 (*Polo like kinase 1*), Aurora y las quinasas Nek. Estas enzimas están relacionadas con el ciclo de los centrosomas y la formación del huso mitótico (Figura 2).

1.3.2. Inhibidores

La actividad de los complejos Cdk/ciclina está controlada por dos familias de inhibidores, la familia INK4, que incluye a las proteínas p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d} y la familia Cip/Kip, formada por las proteínas p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2} (Tabla 2). Los miembros de la familia INK4 son inhibidores específicos de la quinasas Cdk4 y Cdk6, se unen a la región amino terminal de estas Cdks y actúan como inhibidores competitivos de las ciclinas D. Los cuatro miembros de la familia de proteínas INK4 comparten un motivo estructural, las repeticiones de ankirinas (*ankyrin repeats*), que consisten en pares de hélices α antiparalelas unidas por los lados y conectadas por una serie de motivos horquilla (*hairpin*). Mientras que p16^{INK4a} y p15^{INK4b} presentan cuatro repeticiones de ankirina, las proteínas p18^{INK4c} y p19^{INK4d} presentan cinco (Ruas and Peters, 1998). Estos dominios estructurales están involucrados en la unión a la parte no catalítica de Cdk4 y Cdk6, en el lado opuesto al sitio de unión de las ciclinas D. La unión de las proteínas INK4 produce un cambio alostérico en Cdk4/6, lo cual lleva a una alteración en el sitio de unión de las ciclinas D y reduce la afinidad por el ATP (Pavletich, 1999). Finalmente, esto provoca una reducción de la actividad quinasa de Cdk4/6 (Figura 3).

Las proteínas Cip/Kip por el contrario, sólo ejercen una actividad inhibitoria sobre los complejos heterodiméricos Cdk/ciclina aunque en el caso de los complejos Cdk4/6/ciclina D las proteínas Cip/Kip, al menos p21^{Cip1} y p27^{Kip1}, parecen contribuir a su estabilización. De hecho se ha postulado que los complejos Cdk4/6/ciclina D facilitan la progresión de la fase G1/S del ciclo no sólo fosforilando pRb sino también secuestrando a las proteínas Cip/Kip de su unión a los complejos Cdk2/ciclina E y así activando estos últimos (Sherr and Roberts, 1999). De hecho, la acción inhibitoria de las proteínas INK4 se ve reforzada por el hecho de que las proteínas INK4 desplazan a los inhibidores Cip/Kip de los complejos con Cdk4 y Cdk6, que se unen entonces a los complejos Cdk2/ciclina E provocando una inhibición de su actividad quinasa (Sherr and Roberts, 1999).

La actividad quinasa de las Cdks en el ciclo celular, está muy controlada a distintos niveles, en los que se incluyen: interacción con las subunidades activadoras (ciclinas), unión a los inhibidores de las Cdks, fosforilación y desfosforilación, plegamientos y localización subcelular (Malumbres and Barbacid, 2001; Sherr and Roberts, 1999).

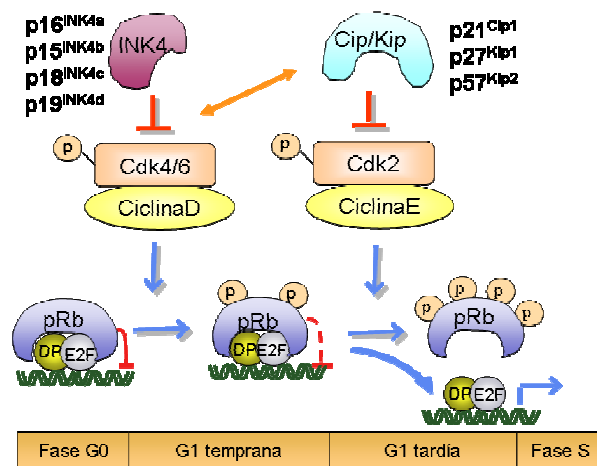


Figura 3: Progresión de G0 a la fase S en células de mamíferos. La figura representa la fosforilación de la proteína retinoblastoma, pRb, por la combinación de las ciclinas de tipo D y su asociación con las quinasas Cdk4 y Cdk6. Se produce una fosforilación adicional de pRb llevada a cabo por el complejo ciclina E y Cdk2. De esta manera, los factores de transcripción de la familia E2F-DP, dejan de estar inhibidos por pRb y son activos. Los inhibidores de la familia Cip / Kip (p21, p27 y p57) regulan la actividad de las quinasas que forman complejo con la ciclina D y E, mientras que los inhibidores de la familia INK4 (p15, p16, p18 y p19) se unen exclusivamente a CDK4 y CDK6.

Como ya se ha descrito anteriormente, existen dos familias de inhibidores, INK4 y Cip / Kip. La unión a los complejos Cdk2 y Cdk1, bloquea la actividad quinasa de los mismos, aunque el papel de Cip o Kip no está del todo claro. Previamente se había observado que p21 y p27 eran esenciales en la formación de dichos complejos, pero esto no está del todo confirmado (Bagui et al., 2003; Sugimoto et al., 2002). Además, estos inhibidores son capaces de bloquear la actividad quinasa de Cdk4-ciclina D y Cdk6-ciclina D, pero no a concentraciones estequiométricas (Sherr and Roberts, 1999). Existen evidencias recientes que demuestran que los inhibidores Cip y Kip pueden bloquear el ciclo celular en ausencia de Cdk2 o Cdk4 y Cdk6 (Malumbres et al., 2004; Martin et al., 2005), aunque puede que la actividad compensadora entre estas Cdk y Cdk1, esté dificultando la identificación de las dianas fisiológicas de estos inhibidores.

Tabla 2: Ciclinas reguladoras e inhibidores de las Cdks en fase G1 y G1/S

Proteína	Reguladores o sustratos	Características
<i>Ciclinas</i>		
Ciclina D1	Cdk4, Cdk6	Sensor mitogénico. Los niveles aumentan en G1 y se mantienen elevados durante todo el ciclo celular. Su deficiencia en ratones provoca una disminución en el tamaño y problemas en la retina y en la glándula mamaria durante el embarazo
Ciclina D2	Cdk4, Cdk6	Se induce directamente por c-myc. Participa en la génesis de los testículos, ovarios y cerebro
Ciclina D3	Cdk4, Cdk6	Sensor mitogénico. Los niveles aumentan en G1 y se mantienen elevados durante todo el ciclo celular
Ciclina E1	Cdk2, Cdk3	Se induce después de la fosforilación inicial de Rb por Cdk4/6. Su función in vivo no ha sido todavía estudiada en animales modificados genéticamente. Sin embargo, su expresión en el locus de la ciclina D1 es capaz de restaurar la mayoría de los defectos que se producen en los ratones deficientes en esta proteína
Ciclina E2	Cdk2, Cdk3	Es similar a la ciclina E1, pero se expresa de forma diferente en los tejidos normales
<i>Inhibidores de Cdks</i>		
p16 ^{INK4a}	Cdk4, Cdk6	Se induce en senescencia y ante estrés oncogénico. No es esencial en ratones pero su ausencia predispone al desarrollo de tumores
p15 ^{INK4b}	Cdk4, Cdk6	Se induce por TGF- β , senescencia y estrés oncogénico. Se reprime por Myc. Su deficiencia predispone de una forma suave al desarrollo de tumores en ratón
p18 ^{INK4c}	Cdk4, Cdk6	Altamente expresada en linfocitos. Su deficiencia en ratones da lugar a una incidencia significativa de tumores de pituitaria y otras neoplasias
p19 ^{INK4d}	Cdk4, Cdk6	Sus niveles varían a lo largo del ciclo celular. Se degrada de forma dependiente del proteosoma
p21 ^{Cip1}	Todas las Cdks	Es mediador de la supresión del crecimiento mediada por p53. Se induce por TGF- β y durante senescencia. Se reprime por Myc. Los niveles de proteína oscilan durante el ciclo celular; alcanzando el máximo en G1. Inhibe Cdk2 y estabiliza los complejos ciclina D-Cdk4/6. Las células que no tienen p21 ^{Cip1} tienen una respuesta defectuosa al daño al DNA y su ausencia in vivo predispone al desarrollo tumoral
p27 ^{Kip1}	Todas las Cdks	Inhibe Cdk2 y estabiliza los complejos ciclina D-Cdk4/6. Media la supresión del crecimiento por TGF- β , inhibición por contacto, privación de suero, cAMP y otros, a pesar de no ser esencial como demuestran estudios genéticos en ratones
p57 ^{Kip2}	Todas las Cdks	Se expresa en células diferenciadas. No se producen cambios en los niveles de proteínas en respuesta a señales mitogénicas o antimitogénicas. Su ausencia en ratones produce letalidad embrionaria debido a defectos en el desarrollo

Las quinasas dependientes de ciclinas necesitan estar fosforiladas en un residuo de treonina para su correcta actividad catalítica, situado en una región específica denominada *T loop*. Esta fosforilación provoca un cambio en su conformación estructural y es llevada a cabo por los complejos CAK como el complejo Cdk7/ciclina H (Nigg, 1996). La fosforilación por CAK provoca una modificación estructural en el *T*

loop, que permite un mejor acceso del ATP, permitiendo la activación completa de la quinasa (Pavletich, 1999). Esta fosforilación es eliminada por una fosfatasa cuya identidad no es conocida aunque se ha propuesto como candidato a KAP/Cdi1 (Poon and Hunter, 1995).

La actividad quinasa de las Cdk's también está controlada por activación o inhibición mediante fosforilación y desfosforilación (Malumbres and Barbacid, 2001). Por un lado, las quinasas Wee1 y Myt1 inhiben la actividad quinasa de los complejos Cdk-ciclina mediante su fosforilación, concretamente en los residuos de treonina y tirosina de la Cdk. La eliminación de estos fosfatos es llevada a cabo por las fosfatasas Cdc25 (de las cuales existen tres variedades, Cdc25A, B y C, en células de mamíferos), que de esta manera actúan como reguladores positivos de la actividad quinasa (figura 4). Mientras que las fosfatasas Cdc25B y C actúan en las fases S y G2/M del ciclo, Cdc25A actúa en la transición G1/S y es responsable de la activación de Cdk2. La regulación de Cdc25A es crítica en la parada en G1 en respuesta al daño al DNA (Mailand et al., 2000). Así, Cdc25A se degrada en respuesta a la radiación UV manteniendo a Cdk2 en un estado inactivo. Si las fosforilaciones que activan y las que inhiben se encuentran en la misma molécula, esto resulta en una quinasa inactiva (Figura 4)

Diversos autores han indicado que la estabilidad proteica y localización subcelular juegan también un papel importante en la regulación de las Cdk's (Yang and Kornbluth, 1999). Así, los complejos activos Cdk-ciclina se encuentran frecuentemente formando parte de complejos proteicos de mayor complejidad en los que se pueden encontrar proteínas del tipo chaperoninas como Hsp90 y otras moléculas que favorecen la formación de complejos estables como Cdc37.

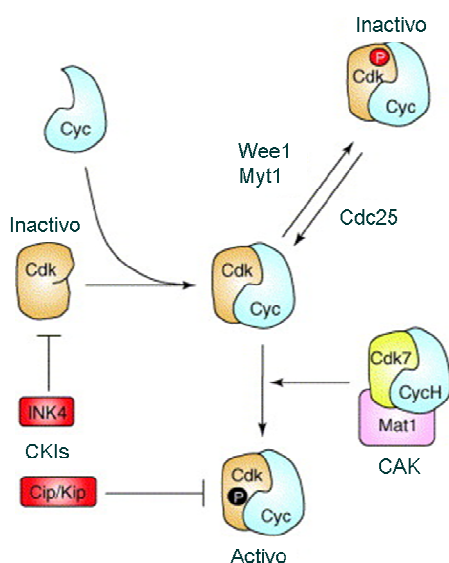


Figura 4: Mecanismos de regulación básicos de las Cdk's. Para que sean activas, necesitan unirse a las ciclinas. Cdk4 y Cdk6 son inhibidas por unión directa a la familia de inhibidores de quinasas INK4. Por el contrario, los inhibidores Cip y Kip bloquean la actividad quinasa mediante la formación de un complejo trimérico inactivo. Las quinasas activadoras (CAK), son capaces de activar los complejos Cdk-ciclina, mediante la fosforilación del dominio de T-loop de la Cdk. Por otro lado, los complejos Cdk-ciclina pueden ser regulados negativamente mediante la fosforilación en residuos adyacentes de treonina o tirosina, por las quinasas Wee1 y Myt1. Estas fosforilaciones inhibitorias, se pueden revertir con las fosfatasas Cdc25, que actúan como reguladores positivos.

Hasta ahora, sólo Cdk4 se ha encontrado mutado cáncer, en concreto en algunos casos de melanoma hereditario. Y además, se ha visto que la sobreexpresión de Cdk6 está relacionada con leucemias y linfomas, como consecuencia de translocaciones cromosómicas (Malumbres and Barbacid, 2005). También se ha visto, que en ciertos tipos de cánceres, como sarcomas, gliomas, cáncer de mama, linfomas y melanomas, Cdk4 y Cdk6 se encuentran amplificados o sobreexpresados. Una fracción importante de casos de cáncer en humanos, portan mutaciones que implican una desregulación de la actividad Cdk. Entre éstas, se pueden incluir la sobreexpresión de ciclinas y la inactivación de los inhibidores de las Cdk, incluyendo miembros de las familias INK4 y Cip/Kip (Malumbres and Barbacid, 2001).

La desregulación de las Cdk, es un hecho frecuente en cáncer, por lo tanto, debido también a la facilidad en la elaboración de drogas contra las quinasas, se ha intentado desarrollar drogas que inhiban estas quinasas. Por el momento sin demasiado éxito (Shapiro, 2006), aunque existen evidencias recientes que sugieren que al menos algunas Cdk podrían ser dianas potenciales para intervenciones terapéuticas al menos en aquellos tumores que sobreexpresen las ciclinas de tipo D. La eliminación de Ciclina D1, uno de los activadores de Cdk4 y Cdk6, confiere resistencia a la inducción, por oncogenes como Ras o ErbB2, de carcinogénesis (Sicinski et al., 1996).

Más recientemente, se ha demostrado que los ratones que expresan un mutante de Ciclina D1 que es capaz de unirse a Cdk4 o Cdk6 pero no lo activa, es resistente al cáncer de mama iniciado por ErbB2, a pesar de tener un desarrollo normal de la glándula mamaria (Landis et al., 2006).

Existe una relevancia clara del control de la transición de la fase G1/S por las Cdk, confirmada por la elevada frecuencia en la desregulación de las kinasas de G1, sobre todo Cdk4 y Cdk6, en las células tumorales. CDK4 en humanos se encuentra frecuentemente amplificada en sarcomas o gliomas, como también en otras enfermedades malignas (Khatib et al., 1993; Reifenberger et al., 1994). CDK6, por otro lado, se encuentra translocado en leucemias crónicas linfocítica (Cavazzini et al., 2008), linfomas de células T (Santamaria et al., 2008), leucemia linfoblástica aguda de células T (Su et al., 2004), leucemia linfoblástica crónica de células B (Hayette et al., 2003), linfomas no Hodgkin (Brito-Babapulle et al., 2002), gliomas y glioblastomas (Costello et al., 1997; Ruano et al., 2006), melanomas (Okamoto et al., 2005), adenocarcinomas de endometrio (Samuelson et al., 2008) o adenocarcinomas de la unión gastroesofágica (van Dekken et al., 2008). Se ha sugerido que CDK6 también puede desempeñar una función como modificador de baja penetrancia en carcinomas

esporádicos de médula de tiroides (Ruiz-Llorente et al., 2007) y se puede usar como marcador independiente de pronóstico en meduloblastomas (Mendrzyk et al., 2005).

Además de estas alteraciones en los loci de CDK4 o CDK6, la mayoría de los tipos de tumores presentan una regulación positiva de estas quinasas, por expresión de las ciclinas D (en algunos casos debido a amplificaciones o translocaciones) o por inactivación de los inhibidores de las ciclinas D-Cdk4/6 (proteínas de la familia INK4). Al menos tres de estas proteínas inhibidoras, p16^{INK4a}, p15^{INK4b} y p18^{INK4c}, se encuentran inactivadas en tumores debido a deleciones, mutaciones o hipermetilaciones de sus promotores y los modelos *in vivo* sugieren que la inactivación concomitante de estos inhibidores da lugar a un efecto oncogénico más fuerte (Krimpenfort et al., 2007; Ramsey et al., 2007). En concreto, la region cromosómica 9p21 que codifica para p16^{INK4a} y p15^{INK4b} es uno de los locus más comúnmente mutados en el cáncer humano (Gil and Peters, 2006; Ortega et al., 2002). Es interesante destacar, que los pocos tumores asociados a mutaciones puntuales que se han encontrado en p16^{INK4a} y p18^{INK4c} evitan la unión, y por lo tanto la inhibición de Cdk4/Cdk6 (Lapointe et al., 1996; Ranade et al., 1995). Por otro lado, se ha encontrado en Cdk4 la mutación puntual (Arg24 to Cys; R24C), que previene la unión de los inhibidores INK4 en los pacientes con melanoma, que presentan la enfermedad de manera esporádica o hereditaria (Steitz et al., 2006; Zuo et al., 1996). Los ratones que portan esta mutación en el locus endógeno de Cdk4, desarrollan un amplio espectro de tumores y son más susceptibles al desarrollo de melanoma (Sotillo et al., 2001a; Sotillo et al., 2001b). La ausencia de inhibición de Cdk4 por todas las proteínas INK4 en los ratones *Cdk4*^{R24C/R24C}, da lugar a un fenotipo más acusado que en el caso de la ausencia de los inhibidores INK4 por separado, como es de esperar por los papeles compensatorios entre estas proteínas (Krimpenfort et al., 2007; Latres et al., 2000; Ramsey et al., 2007). Aunque las proteínas INK4 son funcionales de manera parcial en estos animales, ya que inhiben a Cdk6.

Para entender el efecto único o combinado de la ausencia de inhibición de Cdk4 y Cdk6 por los inhibidores INK4, hemos generado un modelo de ratón *knock in* en el que el alelo normal de Cdk6 (*Cdk6*⁺) se ha sustituido por un alelo mutado, en el que la Arg31 (homóloga de la Arg24 en Cdk4) se ha reemplazado por una cisteína (Cys) (*Cdk6*^{R31C}). Éste, constituye un modelo idóneo para estudiar la función y la regulación de Cdk6 *in vivo* en el control del ciclo celular y en el desarrollo de tumores. Es de destacar además, que este mutante por poseer una actividad quinasa desregulada puede proporcionar información importante sobre la validación de Cdk6 como una diana terapéutica en cáncer humano y puede servir para estudios preclínicos en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas destinadas al control de la

proliferación en tumores. La caracterización de estos mutantes conforma así el principal objetivo desarrollado en esta Memoria de Tesis Doctoral. Así mismo, disponemos en nuestro laboratorio de ratones *knock in* de Cdk4 R24C (Sotillo et al., 2001a), lo cual supone una herramienta muy útil equivalente a la deficiencia completa de los inhibidores INK4. Ambos modelos han sido utilizados a lo largo de esta memoria para estudiar el efecto de la activación de una o ambas de estas proteínas en células o animales normales. La comparación entre la deficiencia en una o ambas de estas proteínas y su activación de una de ellas constituye el marco conceptual donde se desarrolla esta Memoria.

1.4. Fases G2 y M

La fase M, la cual combina la segregación de los componentes celulares o mitosis y la división de la célula en dos, o citocinesis, es la fase morfológicamente más dinámica del ciclo celular. El objetivo más importante de la misma es la segregación de las cromátidas hermanas (cromosomas duplicados) en dos células nuevas, de tal manera que cada célula hija herede un juego completo de cromosomas. Además, cada célula hija debe recibir un centrosoma (el centro organizador de microtúbulos más importante de las células animales) y los complementos apropiados del citoplasma, junto con los orgánulos.

La entrada en mitosis, como ya hemos comentado en el apartado anterior, se induce por un incremento en la actividad de Cdk1-ciclina B, también conocida como MPF (*mitosis promoting factor*). MPF está regulado por las quinasas Myt1 y Wee1, que lo fosforilan e inactivan, por lo tanto, la desfosforilación es un paso limitante para la entrada en mitosis, llevado a cabo por las fosfatasa Cdc25. MPF activada, es capaz de fosforilar numerosos sustratos, incluyendo proteínas que se unen a los microtúbulos, importantes para la condensación de los cromosomas, la rotura de la membrana nuclear, el ensamblaje del huso mitótico y la separación de los centrosomas (Nigg, 2001)

La mitosis se divide en seis fases y los principales eventos de cada una de ellas en una célula animal se pueden resumir de la siguiente manera. Durante profase se inicia la condensación de la cromatina interfásica para dar lugar a los

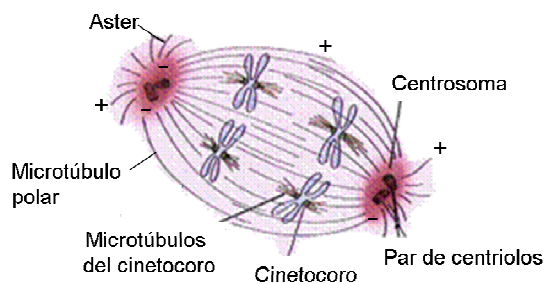


Figura 5: Esquema del aparato mitótico. Se muestran microtúbulos y su orientación (+) polo positivo y (-) polo negativo.

cromosomas. Previamente, los centrosomas se han duplicado y separado, de esta manera, quedan definidos los polos del futuro huso mitótico. Al mismo tiempo, los centrosomas inician el proceso de nucleación de microtúbulos de manera muy dinámica, se reparten hacia todas las direcciones. Algunas proteínas que forman parte del punto de control (*checkpoint*) mitótico, como Bub1 y BubR1 son transportadas hasta los cinetocoros (estructuras proteicas especializadas asociadas con el ADN centromérico, o de la constricción central, de los cromosomas mitóticos, Figura 5). En el momento en el que se rompe la membrana nuclear, al inicio de prometafase, los cromosomas se extienden por el citoplasma y el *checkpoint* mitótico se activa en los casos en los que los cinetocoros de los cromosomas no están unidos a los microtúbulos del huso mitótico. Estos microtúbulos capturan los dos cinetocoros de las parejas de cromátidas duplicadas o cromátidas hermanas, se produce el silenciamiento del *checkpoint* mitótico y los cromosomas se alinean en la placa metafásica mediante una combinación de actividades motoras y dinámicas de los microtúbulos. En este punto, existe un balance de fuerzas muy bien controlado que mantiene a los cromosomas bajo una tensión que evita que se desplacen fuera de la placa metafásica. Una vez que todos los cromosomas se han capturado y están colocados como parejas de cromátidas hermanas (en metafase), se inhibe la señal de espera de anafase (*checkpoint* mitótico) y se inicia la anafase. Durante esta fase, las parejas de cromosomas duplicados se separan hacia los polos y los polos, a su vez, también se separan hacia la corteza celular (anafase A), el huso mitótico se alarga y se produce la separación de las cromátidas hermanas, junto con el inicio de la invaginación de la membrana plasmática a la altura de la placa metafásica. Finalmente, en telofase, la cromatina deja de estar condensada, se forma un anillo contráctil de actina y miosina, se vuelve a formar la membrana nuclear y se termina la citoquinesis (Figura 6) (Suijkerbuijk and Kops, 2008)

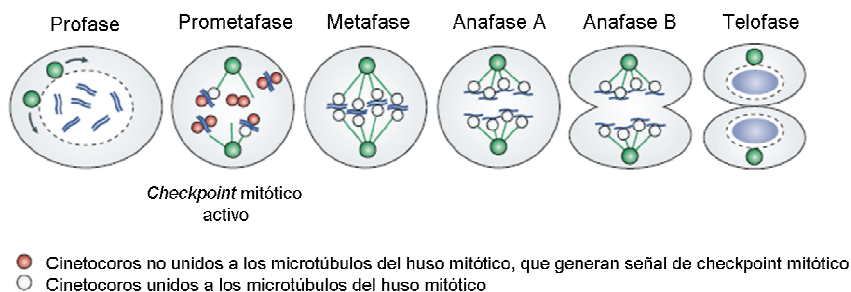


Figura 6: Resumen de las fases de Mitosis. Mediante círculos verdes, se indican los centrosomas, círculos rojos o blancos, los cinetocoros, líneas verdes, los microtúbulos que forman el huso mitótico y en azul el ADN, bien en forma de cromosomas o condensado, o bien en forma de cromatina interfásica o no condensados y la membrana nuclear mediante línea discontinua (figura adaptada de (Suijkerbuijk and Kops, 2008)).

Los mecanismos de vigilancia de la fase M, también llamados *checkpoints*, aseguran el orden y ejecución correctos de los eventos del ciclo celular. Se cree que existen varios *checkpoints* que controlan el paso a través de la fase M en varios estadios (Burke, 2000; Russell, 1998). Algunos, están bien caracterizados, pero en otros casos, no está clara su existencia. El “*checkpoint* de la estructura del ADN”, que arresta las células en la transición G2/M, en respuesta a ADN no replicado o dañado (Russell, 1998) y el “*checkpoint* del ensamblaje del huso mitótico”, que previene el inicio de anafase hasta que todos los cinetocoros de los cromosomas están unidos a los microtúbulos de manera bipolar o que controla la tensión que se forma a partir de una correcta unión bipolar de las cromátidas hermanas (Hardwick, 1998), son los que han sido más estudiados, y por lo tanto, de los que más se sabe y entiende. Aunque existen datos que demuestran la existencia de un “*checkpoint* de posición del huso” que une la salida de la fase M con la orientación correcta del huso, aunque sólo se ha demostrado en *Saccharomyces cerevisiae* (Hoyt, 2000). Tampoco está clara la idea de que exista otro *checkpoint* que controle la separación de los centrosomas al principio de mitosis en células de mamífero (Lane and Nigg, 1996; Scolnick and Halazonetis, 2000) (Figura 7).

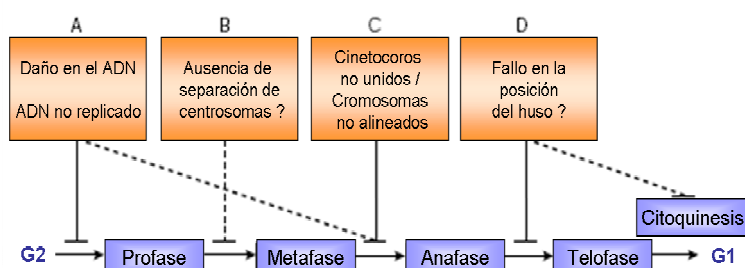


Figura 7: Checkpoints encargados de la progresión a través de la fase M. “*Checkpoint* de la estructura del ADN” (A); “*checkpoint* de separación de centrosomas” (B); “*checkpoint* del ensamblaje del huso” (C); “*checkpoint* de posición del huso” (D). (adaptado de (Nigg, 2001))

1.4.1. Punto de control mitótico

Como ya hemos comentado anteriormente, este punto de control o *checkpoint* controla la unión de los microtúbulos a los cinetocoros y/o la tensión generada por dicha unión de las cromátidas hermanas.

Mediante el uso de mutantes en levaduras, se han identificado seis genes relacionado con este *checkpoint*, las quinasas Mps1p, Bub1p y su pareja Bub3p, y las tres proteínas Mad1p, Mad2p y Mad3p (Hardwick, 1998). Estudios en células animales confirman la importancia de la fosforilación en esta señal (Andersen et al., 1997; Gorbsky, 1997; Nicklas, 1997). Esto, junto con el hecho de que el *checkpoint* de ensamblaje del huso no se activa únicamente en respuesta a daño del huso, contribuye a una correcta coordinación en el inicio de anafase para cada ciclo celular (Basu et al., 1999; Taylor and McKeon, 1997).

De acuerdo con el modelo actual, los cambios estructurales inducidos por la unión de los microtúbulos, se traduce, a través de fosforilaciones, en una señal bioquímica. En vertebrados, se ha propuesto que en esta señal mecánico-química está involucrada una interacción molecular entre la Krp (*kinesin related motor proteins*) Cenp-E y la quinasa BubR1 (Abrieu et al., 2000; Chan et al., 1999; Yao et al., 2000). Se cree que los cinetocoros, que se empiezan a ensamblar en profase recluyen MAD1 (*mitotic arrest deficiente homologue 1*), Mad2, Mps1 (*monopolar spindle 1*), Bub1, Bub3, BubR1 y Cenp-E (*centromere protein E*) en los casos en que no están unidos a los microtúbulos. Estos, funcionan como sitios de ensamblaje continuo y liberación de los complejos Mad2-Cdc20, que impiden la activación de APC/C_{Cdc20}. Para que este proceso se pueda llevar a cabo de forma dinámica, la actividad quinasa de BubR1 es esencial para la señalización del *checkpoint* y se activa por unión a Cenp-E. Cuando el último cinetocoro se une a los microtúbulos, la señal de inhibición del complejo Mad2-Cdc20 cesa, permitiendo de esta manera que Cdc20 se disocie de Mad2 y se active APC/C; como resultado, securina, que se encuentra inhibiendo a separasa, la proteasa que rompe las cohesinas que mantienen unidas las cromátidas hermanas, se degrada (mediante ubiquitinación, Ub). También se degrada de la misma manera, ciclina B1 y se lleva a cabo la anafase (Figura 8). Este modelo deja muchas preguntas sin responder, como puede ser el hecho de cómo interaccionan entre ellas las quinasas que se encuentran en los centrómeros o cinetocoros. Tampoco está claro porqué las células de mamífero expresan dos miembros de la familia Bub1 (Bub1 y BubR1), ya que parece redundante puesto que ambas son necesarias para la señalización del *checkpoint* (Musacchio and Salmon, 2007; Suijkerbuijk and Kops, 2008).

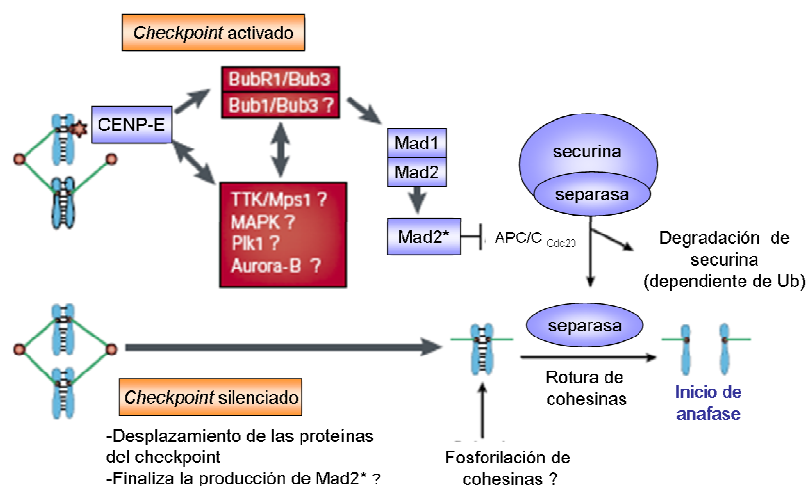


Figura 8: Checkpoint del ensamblaje del huso. Mad2* representa la conformación alterada de Mad2, la cual es capaz de bloquear la interacción entre Cdc20 y APC/C. Bub1 y BubR1, activan las quinasas MAP (Shapiro et al., 1998; Zecevic et al., 1998). Plk1 (Arnaud et al., 1998; Wianny et al., 1998) y aurora B (Adams et al., 2000) también se sabe que están localizadas en los cinetocoros, esto sugiere que podrían tener una función en la señalización o silenciamiento del checkpoint. (Ub: ubiquitina)

1.4.2. Estructura del huso, dinámica y regulación.

En los organismos eucariotas, el huso mitótico está formado por microtúbulos que se extienden desde dos polos opuestos. Estos microtúbulos son cilindros huecos que se forman a partir del ensamblaje de heterodímeros de α/β -tubulina, que se asocian longitudinalmente para formar protofilamentos, 13 de éstos se asocian lateralmente y crean el entramado celular de microtúbulos (Desai and Mitchison, 1997) (Figura 9)

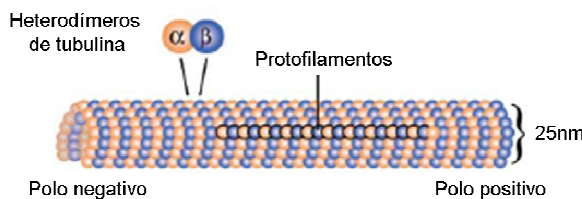


Figura 9: Estructura general de los microtúbulos. En naranja, α -tubulina y en azul β -tubulina. Se destaca un protofilamento entre el entramado de polímeros.

Los microtúbulos mantienen una polaridad y se orientan de manera uniforme. Las subunidades de β -tubulina están expuestas al polo positivo o de polimerización más rápida, que se encuentra en el lugar de anclaje de las cromátidas a los cinetocoros y también se extienden lejos de los polos. Y las subunidades de α -tubulina están expuestas al polo negativo o de polimerización más lenta del microtúbulo, que se encuentran en los polos del huso.

Existen varios tipos de microtúbulos en las células animales (Figura 5):

- Las fibras K o microtúbulos del cinetocoro, los cuales mantienen el anclaje de los cromosomas al huso y permite su alineación y segregación (McIntosh et al., 2002; Rieder and Salmon, 1998)
- Los microtúbulos interpolares, algunos de los cuales se extienden hasta la zona media del huso, con lo que se superponen con los microtúbulos del polo opuesto. Su función principal es la de ayudar a estabilizar el huso bipolar en prometáfase y metafase y permitir de esta manera, la separación de los polos del huso al final de mitosis (Scholey et al., 2003).
- Microtúbulos astrales, los cuales se extienden hacia fuera del huso. Son importantes para la colocación del huso mitótico, especialmente cuando se producen eventos como las divisiones tempranas de los embriones de *Caenorhabditis elegans* (Lyczak et al., 2002)

La propiedad que tienen estos microtúbulos de “inestabilidad dinámica” o de crecimiento y acortamiento continuo, se produce gracias a reacciones de hidrólisis de GTP. GTP se une a β -tubulina, y poco después de que se añada el heterodímero de

tubulina se produce su hidrólisis, por lo tanto la gran masa de polímero de microtúbulos está compuesta de tubulina asociada a GDP, mientras que los heterodímeros que se han añadido recientemente, se encuentran unidos a GTP, estos obligan al resto del polímero a mantener una conformación recta y opuesta a la conformación curva a la que tienden los protofilamentos unidos a GDP. La energía resultante de la hidrólisis del GTP, se almacena en el entramado de microtúbulos. Este mecanismo describe el comportamiento de los microtúbulos, *in vivo* e *in vitro*, donde las poblaciones de microtúbulos contienen polímeros que están creciendo y otros que están acortándose, las transiciones entre estos dos estados son repentinas e impredecibles.

Para una correcta segregación de los cromosomas durante la división celular, es necesaria una adecuada organización de los microtúbulos del huso mitótico. Esto depende de proteínas motoras y no motoras. Éstas últimas poseen diversas funciones, que incluyen nucleación y organización de los microtúbulos, regulación de la forma y tamaño del huso, regulación de la dinámica y actividades motoras y también control de la segregación cromosómica y la progresión del ciclo celular. Estas proteínas no motoras presentan distinta localización y patrón en mitosis y muchas contribuyen a más de una actividad funcional en el huso. Dada esta complejidad, estas proteínas muestran patrones de expresión alterados en cáncer o se encuentran mutadas en enfermedades humanas.

Por otro lado, las proteínas motoras juegan un papel crucial, ya que promueven la organización antiparalela de los microtúbulos que emanan de los centrosomas, con los polos (-) dirigidos hacia los polos del huso y los polos (+) en continua conexión con los cromosomas, los cuales se alinean en el centro del huso en metafase. Las cromátidas hermanas de cada cromosoma duplicado, se mantienen pegadas en toda su longitud y se unen a los microtúbulos del huso a través de sus cinetocoros, que a su vez los conectan con los polos opuestos del huso. En metafase, el huso bipolar está preparado para empujar a las cromátidas hacia los polos opuestos, asegurando que las células hijas reciben el genoma completo.

1.4.3. Orientación del huso mitótico en las divisiones asimétricas.

Las interacciones de los microtúbulos astrales (microtúbulos que se dirigen desde los polos, hacia la corteza celular y el citoplasma) con la corteza celular y los sitios de anclaje citoplasmático, son la principal fuente de información para conocer la orientación del huso, aunque también la forma de la célula puede obligar a definirlo. La posición del huso implica la existencia de fuerzas de arrastre que se ejercen en los microtúbulos astrales, que pueden ser generadas por varios mecanismos:

- Depolimerización de los extremos (+) de los microtúbulos astrales que permanecen anclados en la corteza celular.
- Anclaje de los microtúbulos de los extremos (-) en la corteza y que están ejerciendo una actividad motora.
- Translocación de los microtúbulos de extremos (+) por anclaje a proteínas motoras basadas en actina.

En estos casos, la regulación de la longitud de los microtúbulos es esencial para una correcta orientación del huso, por lo que la “inestabilidad dinámica” de los microtúbulos desempeña un papel muy importante.

El modelo en el que más estudios se han realizado sobre la orientación del huso es en *Saccharomyces cerevisiae*. Se ha comprobado que las proteínas más importantes están conservadas en organismos superiores. El eje de polaridad celular en este tipo de levaduras se usa para dirigir el crecimiento polarizado de la célula hija (yema) y para alinear el huso mitótico y asegurar una correcta segregación del ADN.

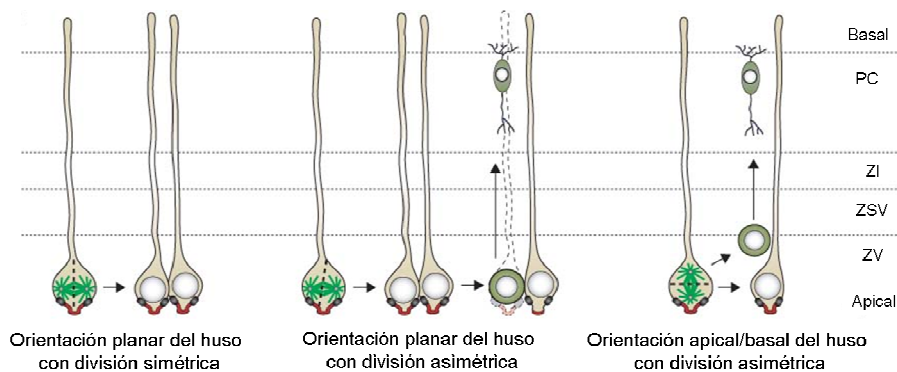


Figura 10: Corteza del neuroepitelio de mamíferos y orientación del huso. Se trata de un epitelio pseudoestratificado en el que se distinguen diversas capas: PC (placa cortical), ZI (zona intermedia), ZSV (zona subventricular) y ZV (zona ventricular). Modificado a partir de (Siller and Doe, 2009)

En *Drosophila*, los estudios de divisiones asimétricas se han centrado en los neuroblastos (células progenitoras del sistema nervioso central). En estadios embrionarios, dichas células se dividen de manera asimétrica y perpendicularmente al plano del neuroectodermo, dando lugar a dos células distintas, una célula que se diferenciará y otra que se mantiene como neuroblasto. Para que esto ocurra, la orientación del huso tiene que estar muy bien regulada.

En mamíferos, los estudios son más limitados, se han centrado sobre todo en el estudio del neuroepitelio. A continuación, se resumen las principales etapas en el desarrollo del neuroepitelio (Figura 10):

- Polaridad de la corteza celular: las células progenitoras del neuroepitelio poseen una polaridad apical/basal, la parte apical contiene las proteínas

Cdc42-Par3-aPKC-Par6 y la proteína transmembrana Prominina (Gotz and Huttner, 2005). La parte basal contiene la proteína LGN (Konno et al., 2008; Morin et al., 2007).

- Orientación planar del huso (o perpendicular al eje apical/basal del progenitor del neuroepitelio). Para que esta orientación se produzca, se necesita que LGN se encuentre en la parte baso-lateral de la célula. LGN se une a NuMA, la cual se asocia con el complejo dineína-dinactina (Merdes et al., 1996). Parece ser que LGN secuestra NuMA-dineína-dinactina hacia el dominio baso-lateral. Las uniones adherentes de la zona subapical también podrían mantener una indicación adicional para la orientación del huso, ya que β -catenina se encuentra formando parte de estas uniones y se une a la dineína (Morin et al., 2007). La unión de NuMA o β -catenina a la dineína, son las responsables de la direccionalidad u orientación del huso.
- Orientación apical/basal del huso (o paralelo al eje apical/basal del progenitor del neuroepitelio). Este tipo de orientación no es muy frecuente durante las fases de neurogénesis de la corteza (Konno et al., 2008), aunque si lo es en la retina (Cayouette et al., 2003; Cayouette and Raff, 2003) y en el caso de los progenitores epiteliales (Lechler and Fuchs, 2005). En la retina, en este tipo de divisiones se encuentra apicalmente la proteína mInsc, la cual se une a LGN (Lechler and Fuchs, 2005; Zigman et al., 2005) y lo recluta al polo apical de la célula, de esta manera, se reorienta el huso mitótico. LGN-NuMA se podría asociar con los microtúbulos a través de la unión de NuMA a dineína (Merdes et al., 1996) para empujar el huso hacia la corteza apical, aunque esto aun no está bien demostrado. Para que se forme el complejo LGN-NuMA, previamente, los complejos de proteínas heterotriméticas G, compuesto por las subunidades α , β y γ se tienen que disociar, liberando la forma activa $G\alpha$ -GDP, que se une a los dominios TRP (tetratricopéptido)-GoLoco de LGN, activandola y permitiendo la unión LGN-NuMA. (Figura 11)

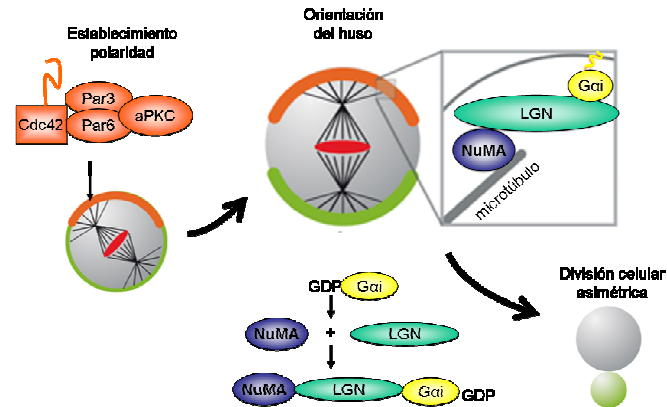


Figura 11: Orientación apical/basal del huso en el neuroepitelio de mamíferos. Al final de interfase y principios de profase, se establece la polaridad en la corteza celular. Las proteínas Par3-Par6-aPKC y Cdc42 se establecen en la parte apical, a las que se posteriormente se une NuMA-LGN-G α (Knoblich, 2008). De esta manera se produce la orientación del huso en prometáfase/metáfase, para finalizar en anafase con un huso mitótico asimétrico dando lugar a dos células hijas de diferentes.

En *Drosophila*, se conocen dos rutas que regulan la orientación de huso mitótico en neuroblastos. Por un lado G α -Pins (LGN en mamíferos)-Mud (NuMA en mamíferos) y por otro Pins-Dlg-Khc73. G α , Pins y Mud son miembros de la ruta del receptor G. (Bowman et al., 2006; Izumi et al., 2006; Parmentier et al., 2000; Schaefer et al., 2001; Schaefer et al., 2000; Siller et al., 2006; Yu et al., 2000). Este primer complejo se une al complejo de proteínas apicales Par mediante la proteína adaptadora Insc. Se sabe que la ruta G α -Pins-Mud tiene lugar porque se produce el reclutamiento de los complejos dineína-dinactina a la parte apical de la corteza, los cuales ejercen fuerzas de tracción que permiten que un centrosomas se mantenga en el polo apical, de esta manera, el huso se alinea siguiendo el eje de polaridad apical/basal. Aunque el complejo dineína-dinactina no se ha demostrado que se encuentre en la corteza apical de los neuroblastos (Siller and Doe, 2008; Siller et al., 2005), como tampoco se ha demostrado la interacción entre Mud y el complejo de dineína-dinactina.

En la segunda ruta de orientación del huso está involucrada Pins, la proteína supresora de tumores Dlg (*Disc large*; un miembro de la familia PSD95 que contiene dominios PDZ, SH3 y GK) y la quinesina de los extremos (+) de los microtúbulos Khc73 (*kinesin heavy chain 73*). Cuando se disminuyen los niveles de Dlg o Khc73, se produce un defecto parcial en la orientación del huso, sin que se produzca ningún efecto en la polaridad cortical de Pins y G α .

2. OBJETIVOS

1. Analizar la relevancia de la regulación de Cdk6 en el ciclo celular y el desarrollo de tumores mediante la caracterización de ratones que portan una mutación en esta proteína que confiere insensibilidad a los inhibidores INK4.
2. Estudiar la relevancia de los inhibidores INK4 in vivo mediante el estudio de células y ratones doblemente mutantes Cdk4R24C; Cdk6R31C, los cuales son completamente insensibles a estos inhibidores.
3. Analizar la relevancia de la proteína NuMA en el control del huso mitótico y su posible relevancia en el desarrollo de diferentes patologías.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ratones modificados genéticamente.

En la Tabla 3 se presenta un resumen de los modelos animales utilizados en la presente memoria. Todos los animales se mantuvieron en el animalario del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO, Madrid) atendiendo a las condiciones sanitarias y éticas requeridas por dicho animalario. Los ratones fueron observados diariamente y sacrificados en cuanto mostraron una enfermedad obvia. Todos los ratones modificados genéticamente y los cruces entre ellos se mantuvieron en un fondo genético mixto 129/SvJxC57BL6/J.

Tabla 3: Cepas de modelos de ratón utilizados. Tg: transgénico. GT: *gene trap*.

Cepa	Modificación genética	Origen
Cdk4 R24C	Alelo <i>knock in</i> que expresa el mutante R24C de Cdk4	(Rane et al. 1999)
p53	Alelo deficiente en p53	IMR Colony, The Jackson Laboratory
Tg-K14-CreERT2	Ratones transgénicos que expresan Cre bajo el control del promotor MMTV (específico de mama)	(Indra et al. 2000)
RERT-Cre	Alelo <i>knock in</i> que permite la expresión ubicua pero inducible de Cre.	(Mijimolle et al. 2005)
Tg-MMTV-Cre	Ratones transgénicos que expresan Cre bajo el control del promotor MMTV (específico de mama)	(Ahmed et al. 2002)
Tg-Nestin-Cre	Ratones transgénicos que expresan Cre bajo el control del promotor de la nestina (específico del sistema nervioso central)	IMR Colony, The Jackson Laboratory
Tg Cre	Ratones transgénicos que expresan Cre bajo el control del promotor CMV	(Barlow et al., 1995)
Cdk6 R31C	Alelo <i>knock in</i> que expresa el mutante R31C de Cdk6	Este trabajo
NuMA cGT	Alelo <i>knock in</i> con inserción vector <i>gene trap</i> condicional que permite expresar lacZ en lugar de NuMA.	Este trabajo

Las secuencias genómicas de ratón (129SVJ) de Cdk6 se obtuvieron de una librería genómica del fago lambda. Se amplificaron mediante PCR, con oligos específicos y usando una polimerasa de alta fidelidad (Expand Fidelity PCR System, Roche). De esta manera, se obtuvieron los brazos de homología que se clonaron en el vector pBH48 (Rane et al., 1999)

Para la mutación en el exón 1 (R31C), se subclonó el fragmento en un vector intermediario y posteriormente se realizó la mutagénesis dirigida (QuickChange Mutagenesis kit, Qiagen). El vector diana resultante, pMM507, fue linearizado y electroporado en células madre embrionarias de ratón R1, y los clones recombinantes se seleccionaron en presencia de G418 y ganciclovir. Se identificaron tres clones positivos mediante la técnica de *Southern blot*, para ello se usaron sondas externas al

vector diana. El clon recombinante que se empleó para generar las quimeras (ESER1.56) fue posteriormente caracterizado mediante la amplificación y secuenciación de las regiones adyacentes. Esto se realizó debido a que en el genoma de ratón existen varios pseudogenes de Cdk6.

El clon seleccionado fue microinyectado en blastocistos de ratón C57BL/6J para la generación de las quimeras. Dichas quimeras fueron posteriormente cruzadas con animales silvestres con el mismo fondo genético. A partir de esos cruces, se obtuvieron animales heterocigotos para el alelo recombinante, los cuales fueron cruzados entre ellos para generar animales heterocigotos para la mutación.

Debido a la estrategia de generación del vector diana, la mutación R31C sólo será activa tras la expresión de la recombinasa Cre, la cual al reconocer los sitios loxP que flanquean al *cassette* de resistencia a neomicina, causará que el alelo pase de ser un *knock out* a ser un *knock in*.

Las células madre embrionarias de ratón que poseen la inserción del vector condicional *gene trap* en el intrón 1 del gen NuMA1 (provenientes del *German gene trap Consortium*) fueron microinyectadas en blastocistos de ratón C57BL/6J y agregadas, en paralelo, en mórulas de ratón CD1 para la generación de quimeras (Figura 12). No se observaron diferencias entre los ratones derivados de los distintos fondos genéticos.

En este caso, puesto que el vector empleado es condicional, la mutación inducida puede ser reparada y reinducida posteriormente gracias al sistema de recombinación específica por recombinasas Flip o Cre.



Figura 12: Fotos de quimeras.
Se han obtenido por agregación y microinyección de células ES positivas para la inserción del vector *gene trap* condicional para la delección de NuMA

3.1.1. *In vitro*: MEFs

Para la activación de la recombinasa Cre inducible en el alelo RERT (Mijimolle et al., 2005), las células (MEFs primarios e inmortales) se trataron con 4OHT (Sigma, H6278) disuelto en etanol absoluto a una concentración final de 500nM, añadido junto con el medio de cultivo. El tratamiento se realizó durante 3 días consecutivos.

3.1.2 *In vivo*: Ratones

- a) Inyección intraperitoneal. Los animales se inyectaron intraperitonealmente con 4OHT (Sigma, H7904) disuelto en aceite de maíz, 100 µl diarios a una concentración de 500 µg/ml y durante 5 días alternos.
- b) Tópicamente. Los animales se pintaron en la espalda (previamente afeitada) con 4OHT disuelto en etanol absoluto, 200 µl diarios a una concentración de 5mg/ml, durante 5 días consecutivos.
- c) En comida (pienso). Los animales fueron previamente alimentados con pienso transgénico sin 4OHT durante 10 días, ya que el pienso que posee 4OHT no es igual al que los ratones consumen habitualmente. Posteriormente, los ratones fueron alimentados durante 4 semanas con pienso con 4OHT.

3.2. Cultivos celulares

Todas las células utilizadas se crecieron en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS; Gibco) y antibióticos (penicilina y estreptomicina) y se mantuvieron en incubadores a 37°C y con 5% de CO₂.

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) se prepararon a partir de embriones de día 13,5 de desarrollo (E13,5). Se aislaron los embriones del útero y se separaron del saco vitelino, eliminando la cabeza y el hígado. El resto del embrión se cortó lo más finamente posible con ayuda de un bisturí en 1 mL de una solución de tripsina-EDTA (tripsina 0,5 g/L, EDTA 0,2 g/L, NaCl 0,85 g/L) y se incubaron durante 5 minutos a 37°C hasta la disgregación parcial del embrión. La suspensión de células procedente de cada embrión se sembró en una placa de cultivo de 150 mm de diámetro. Una vez alcanzado el 70% de confluencia (2-3 días), se recogieron las células después de exposición a tripsina y se congelaron en alícuotas en N₂ líquido. Se consideró como pase 1 de estas células el momento de ponerlas en cultivo una vez descongeladas.

El cultivo seriado 3T3 se llevó a cabo como ya describieron Todaro y Green (Todaro and Green, 1963). Se sembraron 10⁶ células a pase 1 procedentes de 3 embriones diferentes de cada genotipo en placas de 100 mm de diámetro. Transcurridos 3 días se contó el número total de células de cada placa y cada embrión fue separado en tres placas independientes sembrando 10⁶ células en cada una de ellas (3 clones por embrión). A los tres días se contó de nuevo el número total de células en cada una de las placas y se sembró de nuevo 10⁶ células. Este procedimiento se repitió durante 15-20 pases. El número total de células se calculó

multiplicando el número de células de cada pase por el número de células obtenido en el pase anterior y dividido por el número de células sembradas.

Para las curvas de crecimiento, se sembraron las células en placas de 6 pocillos a una densidad de 5×10^5 células por pocillo y se procedió a su conteo en los días sucesivos.

Para la obtención de los virus se transfectaron células Phoenix por el método del fosfato cálcico con vectores retrovirales que expresan distintos genes. Después de la transfección, las células Phoenix se incubaron a 37°C durante 24 horas, se recogió el sobrenadante y se filtró con ayuda de un filtro de 0,45 µm de diámetro. Se diluyó el sobrenadante con medio fresco con polibreno (4 mg/ml). Se añadió el sobrenadante sobre los MEFs y a las 24 horas de la infección se cambió el medio de la infección por medio nuevo.

3.3. Análisis poblaciones hematopoyéticas.

El timo, el bazo y la médula ósea fueron extraídos de ratones silvestres y *knock in* para Cdk6 de camadas jóvenes (10 semanas) para el timo y la médula ósea y mayores (más de 80 semanas) para el timo y el bazo. Dichos tejidos se disgregaron mecánicamente, bien haciéndolos pasar a través de una malla de nylon de 10µm de tamaño de poro o bien haciéndolas pasar a través de agujas de distinto tamaño. Para la disgregación y posteriores lavados se empleó el medio PBS + 2% suero fetal bovino (FBS).

En todos los casos, una vez disgregados los tejidos, se lisaron los eritrocitos usando cloruro amónico al 0,8% (Stem Cell Technologies), 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción de lisis se inactivó con medio DMEM (Gibco) y posteriormente se centrifugó a 1200rpm durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 200µl de PBS + 2%FBS.

La sangre periférica fue extraída, al igual que en el caso anterior, de ratones silvestres y *knock in* de camadas jóvenes, siguiendo el mismo procedimiento detallado anteriormente.

En el caso de embriones, se les extrajo el hígado fetal a día 14.5 de desarrollo embrionario (E14,5). El protocolo es el mismo que en el primer caso.

TIMO: las células aisladas del timo, fueron marcadas con los siguientes anticuerpos: CD8-FITC, CD4-PE, CD44-APC, CD25-PeCy7 (Tabla 8) y las poblaciones identificadas son las señaladas en la Tabla 4.

Tabla 4: Poblaciones de timo identificadas con sus correspondientes marcadores. CD4⁺ y CD8⁺: linfocitos T-4 o T-8 maduros; DP: células dobles positivas para CD4 y CD8; DN: células dobles negativas para CD4 y CD8; DN1-4: células dobles negativas para CD4 y CD8 y positivas o negativas para CD44 y CD25.

Población	Marcadores
CD4 ⁺	CD4 ⁺ , CD8 ⁻
CD8 ⁺	CD4 ⁻ , CD8 ⁺
DP	CD4 ⁺ , CD8 ⁺
DN	CD4 ⁻ , CD8 ⁻
DN1	CD4 ⁻ , CD8 ⁻ , CD44 ⁺ , CD25 ⁻
DN2	CD4 ⁻ , CD8 ⁻ , CD44 ⁺ , CD25 ⁺
DN3	CD4 ⁻ , CD8 ⁻ , CD44 ⁻ , CD25 ⁻
DN4	CD4 ⁻ , CD8 ⁻ , CD44 ⁻ , CD25 ⁺

BAZO: las células aisladas del bazo, fueron marcadas con los siguientes anticuerpos: B220-FITC, CD3-APC, CD4-PE, CD8-PeCy7 (Tabla 8) y las poblaciones identificadas son las señaladas en la Tabla 5.

Tabla 5: Poblaciones de bazo identificadas con sus correspondientes marcadores.

Población	Marcadores
Linfocitos B	B220 ⁺ , CD3 ⁻
Linfocitos T	B220 ⁻ , CD3 ⁺
CD4 ⁺	B220 ⁻ , CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁻
CD8 ⁺	B220 ⁻ , CD3 ⁺ , CD4 ⁻ , CD8 ⁺

MÉDULA ÓSEA E HÍGADO FETAL: en este caso, las células aisladas fueron marcadas con anticuerpos específicos para identificar las poblaciones más inmaduras o precursores hematopoyéticos (Figura 13): Lin (B220, GR1, Mac1, CD3, CD4, CD8, IL7R α) – PeCy7, Sca1 – Biot (SA-Percp), cKit – APC, Fc γ – PE, CD34 – FITC (Tabla 8). Las poblaciones identificadas están en la Tabla 6.

Tabla 6: Poblaciones de la médula ósea y el hígado fetal identificadas con sus correspondientes marcadores. HSC (*hematopoietic stem cell*): células madres hematopoyéticas; CLP (*Common lymphoid progenitors*): precursor común de la línea linfoide; CMP (*Common myeloid progenitors*): precursor común de la línea mieloide; GMP (*Granulocyte - macrophage progenitor*): precursor de granulocitos y macrófagos; MEP (*Megakaryocyte - erythroid progenitor*): precursor de megacariocitos y de la línea eritroide.

Población	Marcadores
HSC	Lin ⁻ IL7R ⁻ c-Kit ⁺ Sca1 ⁺
CLP	Lin ⁻ IL7R ⁺ c-Kit ^{low} Sca1 ^{low}
CMP	Lin ⁻ IL7R ⁻ c-Kit ⁺ Sca1 ⁺ Fc γ R ^{low} CD34 ⁺
GMP	Lin ⁻ IL7R ⁻ c-Kit ⁺ Sca1 ⁻ Fc γ R ^{hi} CD34 ⁺
MEP	Lin ⁻ IL7R ⁻ c-Kit ⁺ Sca1 ⁻ Fc γ R ^{low} CD34 ⁻

Los niveles de poblaciones sanguíneas se estudiaron en sangre periférica de ratones jóvenes (10 semanas) y mayores (más de 80 semanas), utilizando el contador hematológico Abacus Jun Vet

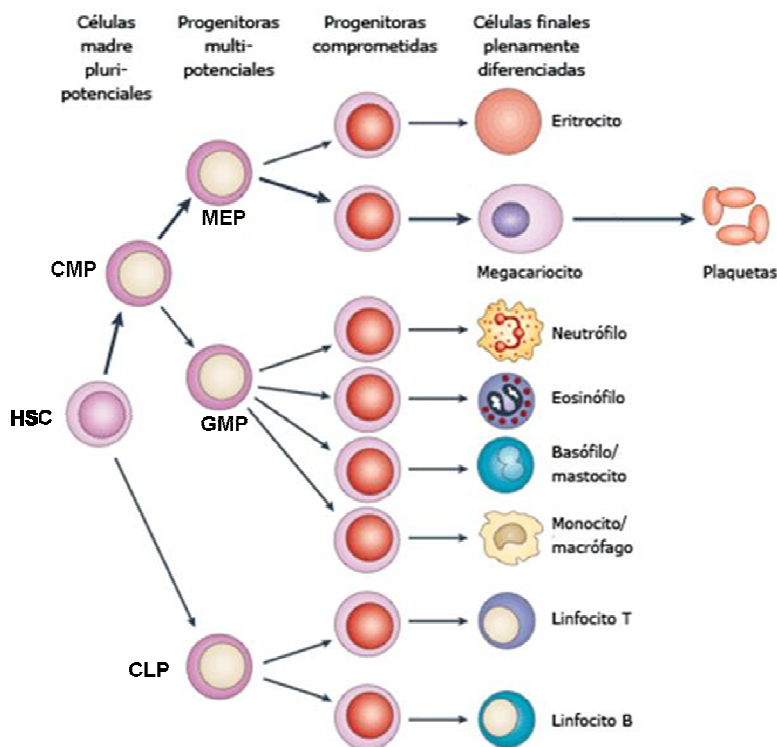


Figura 13: Esquema de las principales poblaciones hematopoyéticas. Se muestran las poblaciones más inmaduras y las poblaciones diferenciadas. HSC (*hematopoietic stem cell*): células madre hematopoyéticas; CMP (*common myeloid progenitor*): progenitor común de la serie mieloide; CLP (*common lymphoid progenitor*): progenitor común de la línea linfóide; MEP (*megakaryocyte – erythrocyte progenitor*): progenitor de eritrocitos y megacariocitos; GMP (*granulocyte – monocyte progenitor*): progenitor de granulocitos y monocitos.

La proliferación de linfocitos se analizó mediante ensayos de incorporación de timidina [^3H], para lo cual se aislaron y sembraron timocitos en placas de 96 pocillos, por triplicado a una concentración de 1×10^6 células/ml, procedentes de ratones de 10 semanas, silvestres y Cdk6 R31C. Fueron estimulados para su proliferación en cultivos con PMA (50ng/ml) e ionomicina (500ng/ml) (Sigma) en presencia de medio completo para linfocitos MCL (RPMI 1640 suplementado con: penicilina/estreptomicina [100mg/ml], β -mercaptoetanol [$3 \times 10^{-5}\text{M}$], Hepes [$25 \times 10^{-3}\text{M}$], L-Glutamina [$2 \times 10^{-3}\text{M}$] y suero fetal bovino (FBS) al 10%). 48 horas después de iniciar el cultivo en presencia o ausencia de los mitógenos (este último como control), se midió la síntesis de ADN incubándolas durante 16 horas con $1 \mu\text{Ci}$ de [^3H]-timidina en cada pocillo (Amersham). La incorporación de radioactividad en el DNA se midió recogiendo las células en filtros de fibra de vidrio (Wallac) por aspiración, usando el colector celular “Harvester 96, Tomtec Mach III M” y cuantificando el número de cuentas por minuto (c.p.m.) en cada

pocillo en un contador de centelleo líquido Wallac MicroBeta Trilux (PerkinElmer). De las tres réplicas de cada muestra se calculó la media y desviación estándar.

Para el ensayo de formación de colonias (CFUs: *colony forming unit*), se utilizó un medio de metilcelulosa completo (Methocult, StemCell Technologies, #03434), que contiene 1% metilcelulosa, 15% FBS, 1% BSA, 10µg/mL insulina, 200 µg/mL transferrina y diversas citoquinas (50ng/mL rm SCF, 10ng/mL rm IL-3, 10ng/mL rh IL-6, 3U/mL rh EPO). Para este ensayo se usaron células aisladas de la misma manera que ya se ha mencionado de diversos tejidos (Tabla 7), se mezclaron con el medio Methocult, se plaquearon e incubaron durante 10 días a 37 °C y 5% CO₂ y en condiciones de humedad elevada hasta que aparecieron las colonias. Se analizaron individualmente y se hizo el recuento de las mismas con la ayuda de un microscopio invertido.

Tabla 7: Tejidos usados, número de células y colonias esperadas en cada caso. Las colonias esperadas en cada caso son: BFU-E (unidad de eclosión eritroide); CFU-GM (unidad formadora de colonias de macrófagos y granulocitos); CFU-GEMM (unidad formadora de colonias de granulocitos, serie eritroide, macrófagos y megacariocitos)

Progenitor	Células / placa 35mm	Colonias esperadas
Médula ósea	2 x 10 ⁴	BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM
Bazo	1 x 10 ⁵	CFU-GM (pocas)
Sangre periférica	1 x 10 ⁵	CFU-GM (pocas)
Hígado fetal (E14,5)	2 x 10 ⁴	BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM

3.4. Análisis histológico / molecular.

Todos los animales se sacrificaron cuando hubo evidencia de algún signo de enfermedad y se recogieron muestras, tanto normales como patológicas, para el análisis histológico y molecular. A nivel embrionario, los embriones se sacrificaron a distintas etapas de desarrollo embrionario, fueron tratados de la misma manera.

Las muestras de tejido destinadas al análisis histológico se mantuvieron para su fijación durante 24 horas en una solución de formalina (Sigma). Las muestras fueron procesadas en parafina (Panreac) y se realizaron cortes de 5 µm de tamaño con ayuda de un microtomo (Leica). Algunas de estas secciones se tiñeron con hematoxilina (Surgipath) y eosina (Surgipath) y se analizaron al microscopio por los Drs. Pierre Dubus (Universidad de Burdeos, Francia) y Marta Cañamero (Programa de Biotecnología, CNIO, Madrid). Otras secciones fueron analizadas mediante tinción inmunohistoquímica con diferentes anticuerpos (v. Tabla 8).

Tabla 8: Anticuerpos empleados para los distintos ensayos: IHC (inmunohistoquímica), FACS (citometría de flujo), IF (inmunofluorescencia), WB (Western blot). NIDDK: National Institute o Diabetes & Digestive & Kidney disease.

Anticuerpo	Antígeno	Tipo	Aplicación ^a	Dilución	Origen
Anti-Bromo-deoxyuridine	Bromo-deoxyuridine	Ratón	IHC	1:50	AMERSHAM
Anti-CD3	CD3e (M-20)	Cabra	IHC	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Anti-LH	LH-beta	Conejo	IHC	1:300	NIDDK
Anti-Prolactina	Prolactina	Conejo	IHC	1:150	NIDDK
Anti-FSH	FSH-beta	Conejo	IHC	1:300	NIDDK
Anti-CD45	CD45R/B220	Rata	IHC	1:100	BD PHARMINGEN
Ki-67-TEC3	KI67	Rata	IHC	1:100	Dako
C3A	Caspasa 3 Activa	Conejo	IHC	1:200	RYD SYSTEMS
Anti-F4/80	F4/80 Pan Macrophages	Rata	IHC	1:25	Santa Cruz Biotechnology
Anti-NuMA	NuMA	Conejo	IHC	1:75	NOVUS BIOLOGICAL
Anti-Pax5	Pax-5 (C-20)	Cabra	IHC	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Ter119	Ter119	Rata	IHC	1:75	BD PHARMINGEN
Anti-MPO	Myeloperoxidasa	Conejo	IHC	1:500	Dako
Anti-Sox2	Sox2	Conejo	IHC	1:300	Chemicon International
Anti-Sox9	Sox9	Conejo	IHC	1:200	Chemicon International
Anti-GFAP	GFAP	Conejo	IHC	1:25	Dako
CD45-PeCy7	CD45R/B220	Rata	FACS	1:200	BD PHARMINGEN
Gr1-PeCy7	Gr1	Rata	FACS	1:200	BD PHARMINGEN
CD11b-PeCy7	CD11b	Rata	FACS	1:200	BD PHARMINGEN
CD3e-PE	CD3e	Rata	FACS	1:200	BD PHARMINGEN
CD3e-PeCy7	CD3e	Rata	FACS	1:200	BD PHARMINGEN
CD4-PeCy7	CD4	Rata	FACS	1:200	BD PHARMINGEN
CD4-PE	CD4	Rata	FACS	1:200	BD PHARMINGEN
CD8a-PeCy7	CD8a	Rata	FACS	1:200	BD PHARMINGEN
CD8a-FITC	CD8a	Rata	FACS	1:200	BD PHARMINGEN
IL-7Ra-PeCy7	IL-7Ra	Rata	FACS	1:200	eBIOSCIENCE
IL-7Ra-PE	IL-7Ra	Rata	FACS	1:200	BD PHARMINGEN
Sca1-Biotina	Sca1	Rata	FACS	1:200	BD PHARMINGEN
cKit-APC	cKit	Rata	FACS	1:400	BD PHARMINGEN
CD34-FITC	CD34	Rata	FACS	1:50	eBIOSCIENCE
FcyR-PE	FcyR	Rata	FACS	1:50	BD PHARMINGEN
CD25-PerCP	CD25	Rata	FACS	1:200	BD PHARMINGEN
CD44-APC	CD44	Rata	FACS	1:400	BD PHARMINGEN
B220-FITC	B220	Rata	FACS	1:200	BD PHARMINGEN
Anti-NuMA	NuMA	Conejo	IF	1:250	NOVUS BIOLOGICAL
Anti- γ -tubulina	γ -tubulina	Mouse	IF	1:400	SIGMA
Anti- α -tubulina	α -tubulina	Rata	IF	1:1	ECACC
Anti-Cdk6	Cdk6	Mouse	WB	1:500	M. Barbacid
Anti-p16	p16	Rata	WB	1:500	Santa Cruz Biotechnology

3.5. Análisis ADN / ARN

El ADN fue extraído a partir de tejido o de células siguiendo el mismo protocolo. Los tejidos o células fueron colocados en tubos de 1,5 ml que contenían 0,5 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, EDTA 10mM, SDS 0,5%, NaCl 0,1M). Se añadió proteinasa K a una concentración final de 100 mg/ml y se incubó a 55°C durante toda la noche. El lisado fue extraído con 300µl de NaCl 5M y posteriormente el ADN se precipitó añadiendo 0,7 volúmenes de isopropanol y se disolvió en agua. La concentración del ADN se determinó usando un espectrofotómetro y las muestras se conservaron a -20 °C hasta el momento de su utilización.

Tabla 9: Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los diferentes loci. El tamaño de la banda resultante después de realizar la correspondiente PCR se indica en pares de bases (pb). La letra F corresponde al oligonucleótido directo (forward) y la letra R para el oligonucleótido inverso (reverse). *Para el genotipado del gene trap de NuMA1, existen varias posibilidades: alelo silvestre (oligos NuMA wtF2 y NuMA wtR2), alelo loxfrt o KI (oligos NuMA wtF2 y B32), alelo lox o alelo frt (oligos NuMA wtF2 y MM239) y presencia del gene trap (oligos B32 y SR2).

Locus	ID oligo	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Cdk6	Cdk6 ex1_1_F Cdk6 in1_2_R	CGGTTCCACTGTGCCGCACCC CCCTAAAGACACCCAACGCC	silvestre: 450 R31Cl: 550
Cdk4	Cdk4 R24C_F Cdk4 R24C_R	CTTAGCCGAGCGTAAGGTGAGT CATAGGCACCGACACCAATTT	Silvestre: 450 R24C: 550
p53	p53f_12B7 p53r_1B3 pPNTf_2B5	TGGTTTGTGCGTCTTAGAGACAGT AAGGATAGGTCGGCGGTTTCAT CCAGCTCATTCCTCCCACTCA	silvestre: 480 KO: 330
NuMA1	NuMA wtF2 NuMA wtR2	GAGGCCTGAGCTGAAAGTTAGTGC GCTCCAATTCAGAGATCTGCCTGC	silvestre*: 250 loxfrt*: 900
βgeo	B32	CAAGGCGATTAAGTTGGGTAACG	lox o frt*: 825
pFlipRosaβgeo	SR2	GCCAAACCTACAGGTGGGGTCTTT	cGT*: 550
Neo	MM239	TCTATCGCCTTCTTGACGAGTT	K*: 750
Cre	Cre_F Cre_R	CCGGTTATTCAACTTGCACC CTGCATTACCGGTCGATGCAAC	Tg: 149
Flp	Flp_F Flp_R	CTAATGTTGTGGGAAATTGGAGC CTCGAGGATAACTTGTTTATTGC	Tg: 600
RERT-Cre	Pol2a F Pol2a R ESR-F	CCAGATGACAGCGATGAGGA CCTCTCTGAGCCTCAATTAAGCAG TGAGTAACAAAGGCATGGAGCA	silvestre: 480 KI: 390
Actina	Actina-F Actina-R	TCATCAGGTAGTCAGTGAGGTCGC CACCACACCTTCTACAATGAGCTG	silvestre: 451
NuMA1	NuMA1 3NuMA	AACAAGTTGAGGTGAGGTGTGGTCC CTTTCTGATTCTAGCTCACTCC	213
NuMA1	RT17_NuMAF' RT20_NuMAR	CAGCTTCACCTATCTCCAGCGCC GATGGTGGCCAGGCTCAGGGTAGG	590
Neo	NEO GT F NEO GT R	CGAAGAGCATCAGGGGCTCG GCGATAGAAGGCGATGCGCT	298

Tras la extracción del ADN y mediante la técnica de *Southern blot*, se seleccionaron los clones positivos o recombinantes una vez electroporado el vector diana en las células madre embrionarias de ratón R1. En el caso del vector diana para la mutación Cdk6 R31C, el ADN genómico de las células ES se digirió con la enzima de restricción concentrada a 50u/μl, *Pst*I (Fermentas). De esta manera, mediante el uso de una sonda marcada radiactivamente (³²P) externa al vector, pudimos diferenciar el alelo silvestre del alelo recombinante (7,3kb y 5,7kb respectivamente).

La identificación de los distintos genotipos de las líneas de ratón analizadas se realizó por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos para cada caso (Tabla 9)

Para determinar la localización exacta del *gene trap* de NuMA1, empleamos el kit *Genome Walker* o Paseo Cromosómico del genoma de ratón (Clontech). Para ello, seguimos una serie de pasos. En primer lugar, la construcción de cuatro librerías de ADN genómico de ratón, generadas mediante la digestión de cuatro enzimas de restricción (*Dra*I, *Eco*RV, *Pvu*II y *Stu*I), a las cuales se les introduce, mediante una reacción de ligación, unas secuencias adaptadoras en sus extremos (Figura 14). Posteriormente, se realizaron dos reacciones de PCR por librería. La primera emplea un oligo “adaptador” (AP1: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3') y un oligo específico para el gen (β-geo1: 5'-GGA CTA CTG CGC CCT ACA GAT CTG CA-3'). El producto de esta primera PCR se diluye y se emplea como molde para la segunda reacción de PCR, la cual también emplea otro oligo específico del adaptador (AP2: 5'-ACT ATA GGG CAC GCG TGG T-3') y otro oligo específico del gen (β-geo2: 5'-GTG CGC ATA GTG GCT TGA ATC GAT AA-3'). Los productos de ADN generados, los cuales empiezan con una secuencia conocida en el extremo 5', fueron clonados y posteriormente caracterizados.

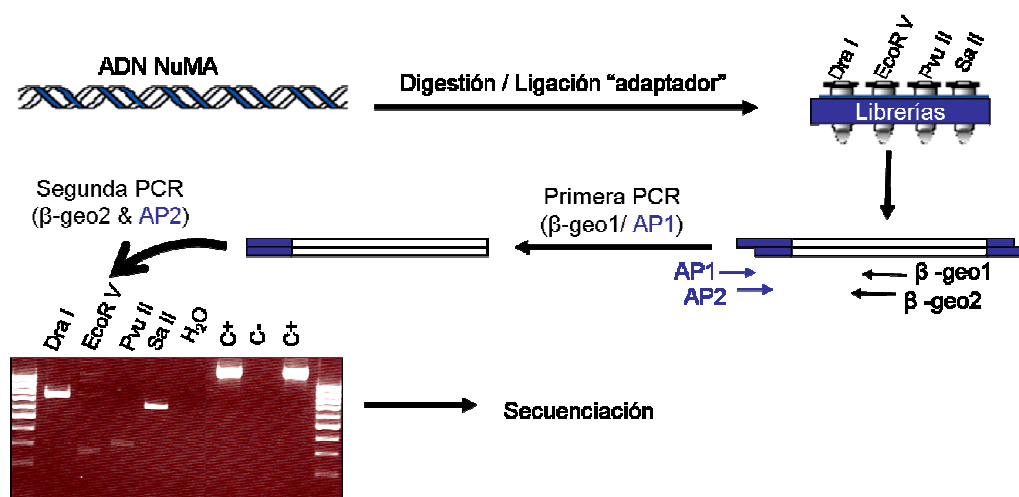


Figura 14: Paseo cromosómico. El ADN genómico de ratón, en el cual se encuentra el gen de interés, NuMA, se digiere con una serie de enzimas de restricción (DraI, EcoRV, PvuII y Sal I), posteriormente, mediante una reacción de ligación, se añade una secuencia conocida o adaptador a los extremos digeridos, generando cuatro librerías. A partir de éstas, se realizan dos reacciones de PCR consecutivas, y el resultado se clona en un vector intermediario y se manda a secuenciar.

Para la extracción del ARN total se utilizó el kit RNeasy (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad de ARN se evaluó mediante el espectrofotómetro. Para la RT-PCR se utilizaron 5µg de RNA y se siguió el protocolo del kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Los oligos empleados vienen detallados en la tabla 9.

3.6. Análisis molecular a nivel de proteína.

Las células cultivadas se lisaron en solución RIPA que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 2mM de EDTA y una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Calbiochem) y fosfatasa (Calbiochem). Estos lisados se cuantificaron mediante el método Bradford y 250 mg de proteína fueron utilizados en la inmunoprecipitación.

Para la inmunoprecipitación, los lisados celulares se lavaron previamente en 100 mL de bolas de proteína A (Amersham Biosciences) durante 1h, a 4°C y en agitación para evitar posibles asociaciones inespecíficas. A continuación, el sobrenadante se incubó con 5 mg de anticuerpo anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology) durante 2 horas y después con 60 mL de bolas de proteína A (Amersham Biosciences) en agitación a 4°C durante 2 horas. Después de varios lavados en solución RIPA el inmunoprecipitado asociado a las bolas se resuspendió en 25 mL de buffer Laemli 5x

(60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol) y se cargó en un gel de poliacrilamida al 8%. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad), mediante transferencia húmeda, utilizando el aparato Trans-Blot de BioRad. Después del bloqueo de la membrana con 5% de leche desnatada, la membrana fue sometida a inmunodetección usando anticuerpos contra Cdk6 y p16 (Tabla 8).

4 . RESULTADOS

4.1. Generación de ratones *Cdk6* R31C.

Uno de los objetivos principales de esta tesis es la caracterización del efecto de la resistencia de *Cdk6* a los inhibidores INK4 mediante la generación y caracterización de ratones *knock in* para *Cdk6*. Para modificar el locus de *Cdk6* por recombinación homóloga en células madre embrionarias (ES), se generó un vector de recombinación, con el exón 1 de *Cdk6* y sitios loxP flanqueando el cassette PGK-neo para la selección posterior de las células recombinantes (Figura 15). Además, se sustituyó la secuencia GCCCGC (Ala30-Arg31) situada en el exón 1 por GCATGC. La mutación puntual en el codón 31 (CGC→TGC) da lugar a la sustitución del residuo normal de arginina (R31) por una cisteína (mutación R31C), la cual ya se sabe que evita la unión de los inhibidores de la familia INK4 (Ericson et al., 2003). Ambos, el exón 1 y el *cassette* PGK-neo están flanqueados por aproximadamente 5 kb de brazos de homología para facilitar la recombinación homóloga en las células ES. Los clones recombinantes se usaron para generar ratones quimeras por microinyección en blastocistos de ratones silvestres, con un fondo genético C57BL/6J. Las quimeras que obtuvimos, las cruzamos con ratones silvestres para que se produjera la transmisión del alelo *Cdk6* recombinante (llamado *Cdk6*^{+/neo}). Los cruces entre estos ratones heterocigotos obtenidos, dieron lugar a ratones *Cdk6*^{neo/neo} en una proporción mendeliana. Estos animales *Cdk6*^{neo/neo} presentan una expresión defectuosa de *Cdk6*, y se comportan como los ratones *Cdk6*^{-/-} previamente generados en nuestro laboratorio (Malumbres et al., 2004), esto sugiere que la presencia del *cassette* neo en el intrón 1 interfiere en la transcripción de los transcritos normales de *Cdk6* (datos no mostrados). Para generar los ratones *Cdk6*^{+/R31C}, se cruzaron animales *Cdk6*^{+/neo} con ratones transgénicos CMV-Cre (Schwenk et al., 1995). Los cruces entre estos animales heterocigotos dieron lugar a ratones *Cdk6*^{R31C/R31C} (Figura 15) en proporciones mendelianas.

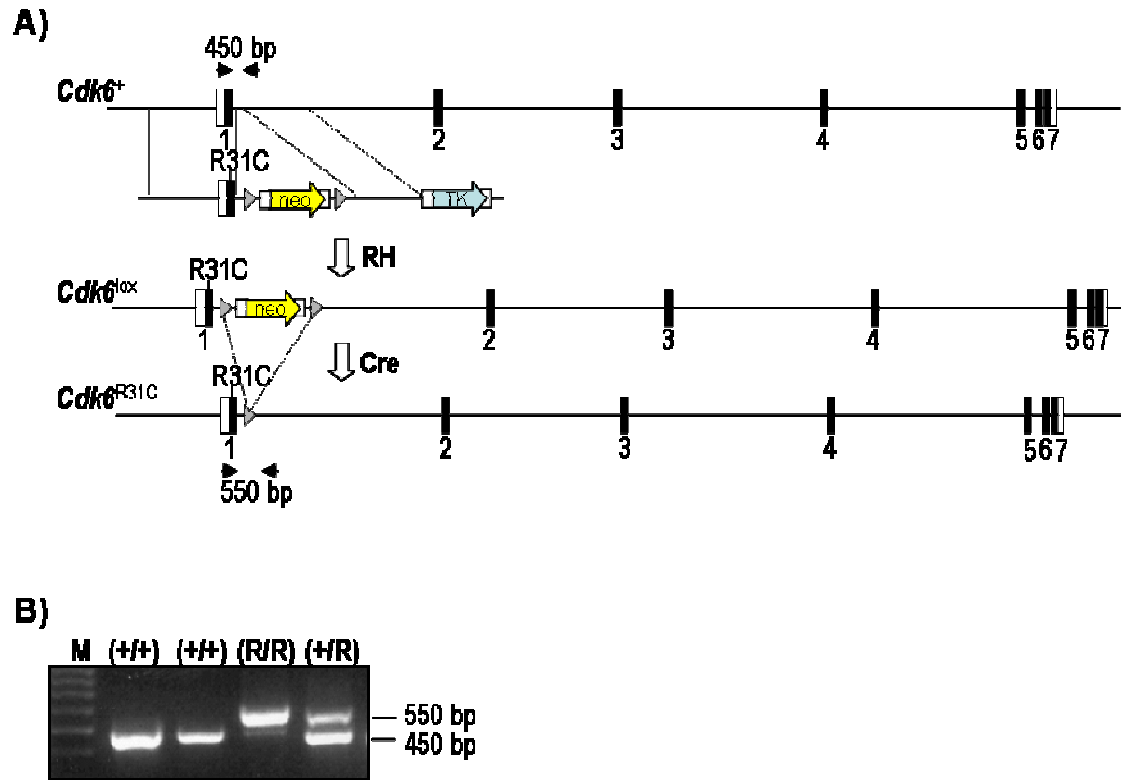


Figura 15: Esquema del locus de *Cdk6* y de la generación de los alelos modificados. A) *Cdk6*⁺: alelo silvestre intacto; *Cdk6*^{lox}: alelo obtenido después de la recombinação homóloga (RH) del vector diana en células ES; *Cdk6*^{R31C}: alelo *knock in* obtenido después de que la recombinasa Cre reconozca los sitios lox P, en este caso se expresa la mutación R31C que evita la unión de los inhibidores INK4 a *Cdk6*. El vector diana presenta brazos de homología de aproximadamente 5kb, el cassette PGK-neo (selección positiva) flanqueado por sitios lox P y el cassette TK (por *Thymidine Kinase*) para la selección negativa. B) Estrategia de genotipado por PCR usando los oligos indicados con flechas en la figura 1A.

Para determinar los efectos del alelo *Cdk6*^{R31C} en la proliferación celular, se establecieron cultivos de fibroblastos procedentes de embriones de día 13,5 de desarrollo embrionario de los genotipos: *Cdk6*^{+/+}, *Cdk6*^{+/R31C} y *Cdk6*^{R31C/R31C}. Estas células crecieron sin problemas en cultivo y con los mismos tiempos de replicación en todos los casos (mirar abajo). *Cdk6*^{R31C/R31C} expresa niveles normales de la proteína mutante *Cdk6*, indicando que la presencia de los sitios lox P no altera la transcripción de *Cdk6*. De todas formas, mientras las células silvestres de pase 4, contienen complejos *Cdk6*-INK4, la proteína *Cdk6* que se expresa en las células *Cdk6*^{R31C/R31C} no es capaz de unirse a los inhibidores INK4 debido a la mutación R31C.

Los ensayos de proliferación que realizamos se basaron en el estudio del comportamiento en cultivo de los MEFs de genotipos: *Cdk6*^{+/+}, *Cdk6*^{R31C/R31C}, *Cdk4*^{R24C/R24C} y *Cdk6*^{R31C/R31C}; *Cdk4*^{R24C/R24C}. En primer lugar, el estudio del tiempo de duplicación de los fibroblastos en cultivo mediante curvas de crecimiento (v. Materiales y Métodos), indicó que los genotipos *knock in* de *Cdk6*; *Cdk4* o el doble *knock in* tienen

un crecimiento normal y comparable con el silvestre en condiciones de cultivo estándar (10% de suero en medio de cultivo), aunque se pudo observar un ligero incremento de proliferación en los genotipos que portan el alelo *Cdk4*^{R24C} (Figura 16 A). Este dato corrobora estudios previamente realizados con el modelo de ratón *Cdk4*^{R24C} (Sotillo et al., 2001a). Por otro lado, se analizó el proceso de immortalización, siguiendo el protocolo 3T3 de cultivo seriado (Todaro and Green, 1963) (v. Materiales y Métodos). En estas condiciones, las células primarias tienen una alta tasa de proliferación durante los primeros pases, sin embargo, el crecimiento del cultivo va disminuyendo al aumentar el número de pases y las células entran finalmente en una senescencia replicativa, donde el número de células no aumenta durante varios pases. Si se mantienen las condiciones de cultivo, aparecen células que han adquirido mutaciones immortalizantes, que se extienden y dan lugar a un cultivo inmortal (Rittling, 1996). El resultado del estudio de immortalización (Figura 16 B) nos indica que las células con genotipo *Cdk6*^{R31C} se comportan de manera similar a los fibroblastos de embriones silvestres, y que las células primarias con genotipo *Cdk4*^{R24C} no parecen pasar un período de crisis muy acusado, comportándose prácticamente como células inmortales (Sotillo et al., 2001a).

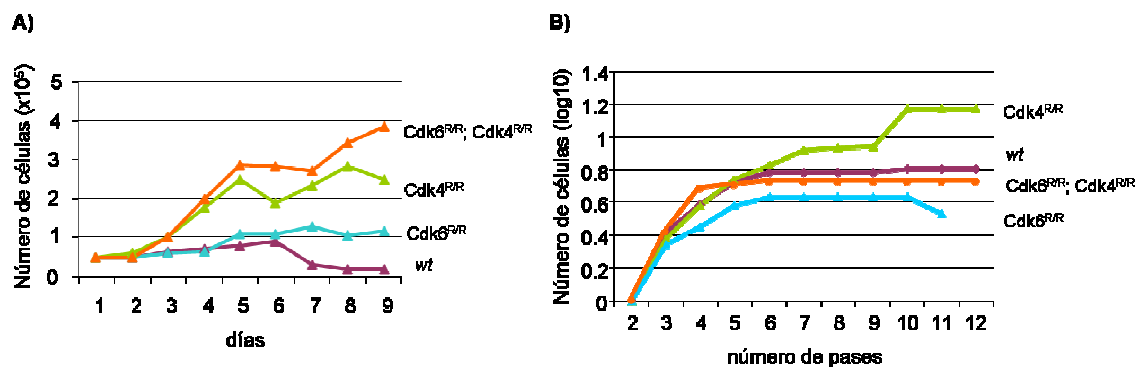


Figura 16: Propiedades de crecimiento de los MEFs. A) Curva de crecimiento en placa mostrando mayor densidad en los cultivos de los MEFs con el alelo *Cdk4*^{R24C}. B) Inmortalización mediante un protocolo 3T3. Ambos ensayos se realizaron con dos clones de MEFs diferentes para cada genotipo, y cada uno de ellos por triplicado. Se muestran las medias.

4.2. Hematopoyesis en ratones Cdk6 R31C

Según el concepto clásico de ciclo celular, existen Cdks específicas que dirigen cada fase del ciclo celular (v. Introducción). La generación y caracterización de los distintos *ko* de los loci de las Cdks en ratón nos muestra que Cdk2, Cdk4 y Cdk6 no son esenciales para el ciclo celular de la mayoría de los tipos celulares, aunque la pérdida de cada una de esas Cdks da lugar a defectos de desarrollo en tipos celulares altamente especializados. En el caso de Cdk6, se sabe que su ausencia causa defectos en la línea eritroide. También es interesante destacar que el doble *ko* para Cdk4 y Cdk6 da lugar a una proliferación defectuosa de los precursores hematopoyéticos, produciendo letalidad embrionaria tardía (Malumbres et al., 2004).

Los ratones *Cdk6*^{R31C/R31C} se desarrollan de manera normal durante los primeros meses de vida y son fértiles. El estudio histológico de ratones jóvenes (2-3 meses) nos indica que existe un defecto específico en el desarrollo hematopoyético con una hiperplasia de linfocitos T en los ratones de genotipo *Cdk6*^{R31C/R31C}.

Los ratones mutantes *Cdk6*^{R31C/R31C} presentan un incremento del 40% en la letalidad después del primer año de vida. Estos ratones mueren antes de que alcancen las 100 semanas, edad en la que los ratones *Cdk6*^{+/+} aun están vivos (Figura 17 A). Las patologías observadas en estos ratones, incluyen linfomas de células B, angiosarcomas o adenomas de hipófisis (Tabla 10 y Figura 17 B y C). Otras patologías incluyen hiperplasia endocrina del páncreas, metaplasia escamosa y glandular del estómago, hepatitis granulomatosa y hemangiomas en el hígado (Tabla 10). Algunas patologías, como calcificaciones y ensanchamiento de los túbulos en los testículos y el fenotipo lactante con calcificaciones en la glándula mamaria, pueden ser derivadas de defectos en la hipófisis.

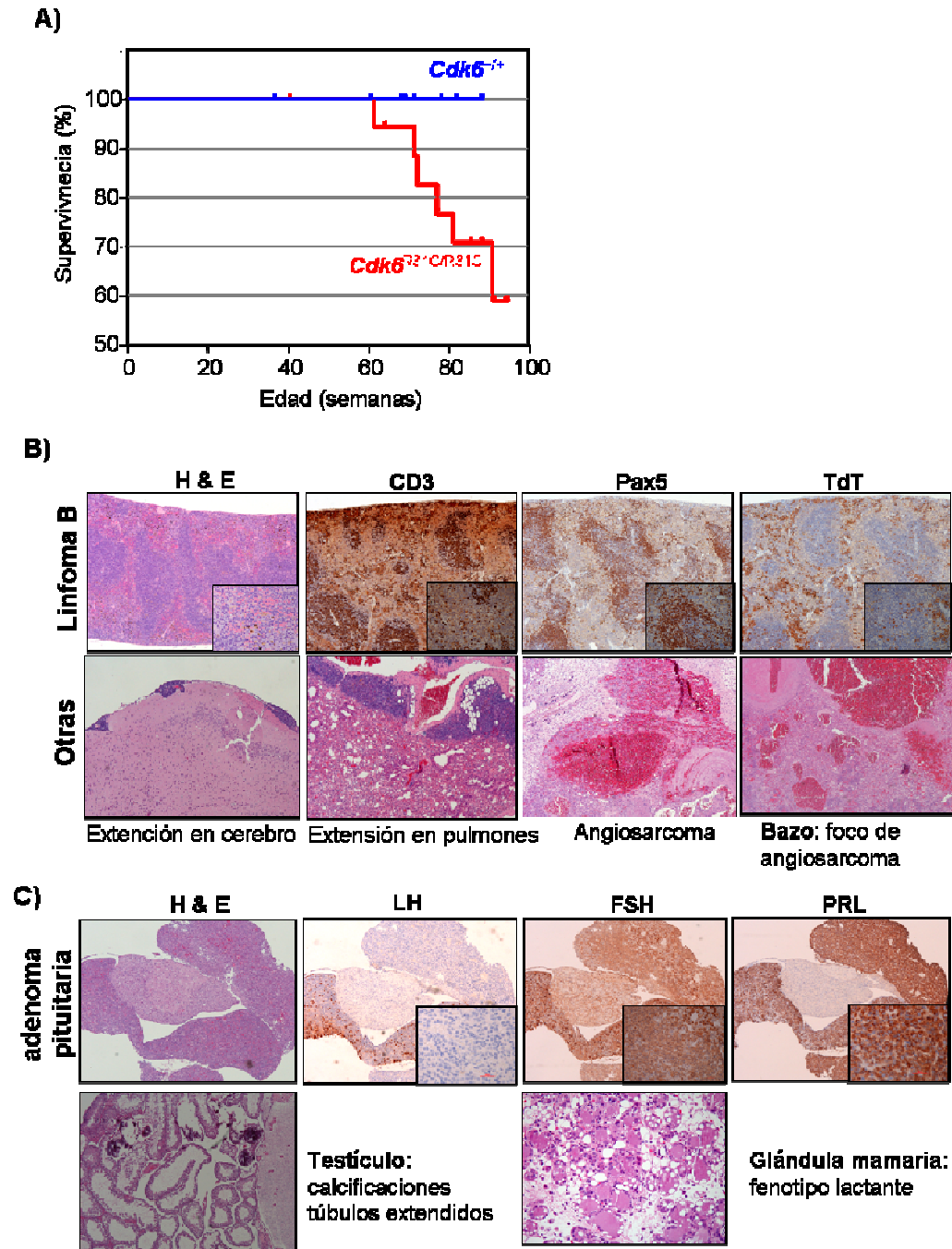


Figura 17: Supervivencia y patologías de los animales *Cdk6*^{R31C/R31C}. A) Curva de supervivencia de ratones *Cdk6*^{R31C/R31C} y *Cdk6*^{+/+}. B) Secciones representativas de cortes histológicos de patologías de ratones *Cdk6*^{R31C/R31C}. Se muestra un ejemplo de linfoma B con algunas extensiones (en cerebro y pulmones) y dos angiosarcomas. C) Ejemplo de adenoma de pituitaria con algunas patologías asociadas. H & E (hematoxilina y eosina), LH (hormona luteinizante), FSH (hormona foliculoestimulante), PRL (prolactina).

Tabla 10: Tabla de las principales patologías observadas en los ratones *Cdk6*^{R31C/R31C}

Patología	<i>Cdk6</i> ^{+/+}		<i>Cdk6</i> ^{R31C/R31C}	
	Incidencia ¹	Latencia ²	Incidencia ¹	Latencia ²
Hiperplasia en el timo e hyperplasia de células T	0	-	90 (5/6)	4
Linfoma B	0	-	40 (2/5)	16
Adenoma de hipófisis	0	-	40 (2/5)	16
Angiosarcoma	0	-	33 (2/6)	16
Carcinoma de estómago	0	-	17 (1/6)	16
Hiperplasia endocrina del páncreas	0	-	25 (1/4)	16
Pancreatitis con infiltraciones focales de grasa	0	-	25 (1/4)	16
Adenoma de pulmón	0	-	17 (1/6)	21

¹ La incidencia se representa en %. El número de ratones con el fenotipo observado *versus* el número total de ratones analizados se indica entre paréntesis.

² Latencia en meses.

Las patologías linfoides se caracterizan por hiperplasia de células T en animales jóvenes y linfomas en animales viejos. Para analizar en detalle las poblaciones hematopoyéticas, se realizó una cuantificación de las células T y de los progenitores más tempranos, mediante tinción con marcadores específicos (v. Materiales y Métodos)

En el análisis de los progenitores hematopoyéticos inmaduros de los ratones mutantes *Cdk6*^{R31C/R31C} utilizando células de médula ósea, no se observaron diferencias significativas con los ratones silvestres en las poblaciones de células madre hematopoyéticas (Lin⁻; IL7R⁻; c-Kit⁺; Sca1⁺), de células progenitoras linfoides (Lin⁻; IL7R⁺; c-Kit^{low}; Sca1^{low}), de células progenitoras de megacariocitos y eritrocitos (Lin⁻; IL7R⁻; c-Kit⁺; Sca1⁻; FcγR^{low}; CD34⁻), de células progenitoras mieloides (Lin⁻; IL7R⁻; c-Kit⁺; Sca1⁺; FcγR^{low}; CD34⁺) y de células progenitoras de granulocitos y macrófagos (Lin⁻; IL7R⁻; c-Kit⁺; Sca1⁻; FcγR^{hi}; CD34⁺). Sin embargo, en los ratones *Cdk6*^{R31C/R31C}, se puede apreciar en general un ligero incremento de todos los progenitores, con excepción de las células progenitoras de megacariocitos y eritrocitos y de las células progenitoras de la línea linfóide (Figura 18 A y B). Estos análisis se realizaron en animales jóvenes, de unas 10 semanas de edad.

Con el objeto de completar el estudio y de analizar el potencial proliferativo de estos precursores, realizamos un ensayo funcional de formación de colonias en metilcelulosa. Para ello empleamos un medio completo que nos permite cuantificar, sobre todo, el número de unidades formadoras de colonias para granulocitos y macrófagos. El resultado obtenido no indica diferencias importantes de proliferación

entre las células progenitoras de la médula ósea de ratones $Cdk6^{R31C/R31C}$ y $Cdk6^{+/+}$ (Figura 18 C).

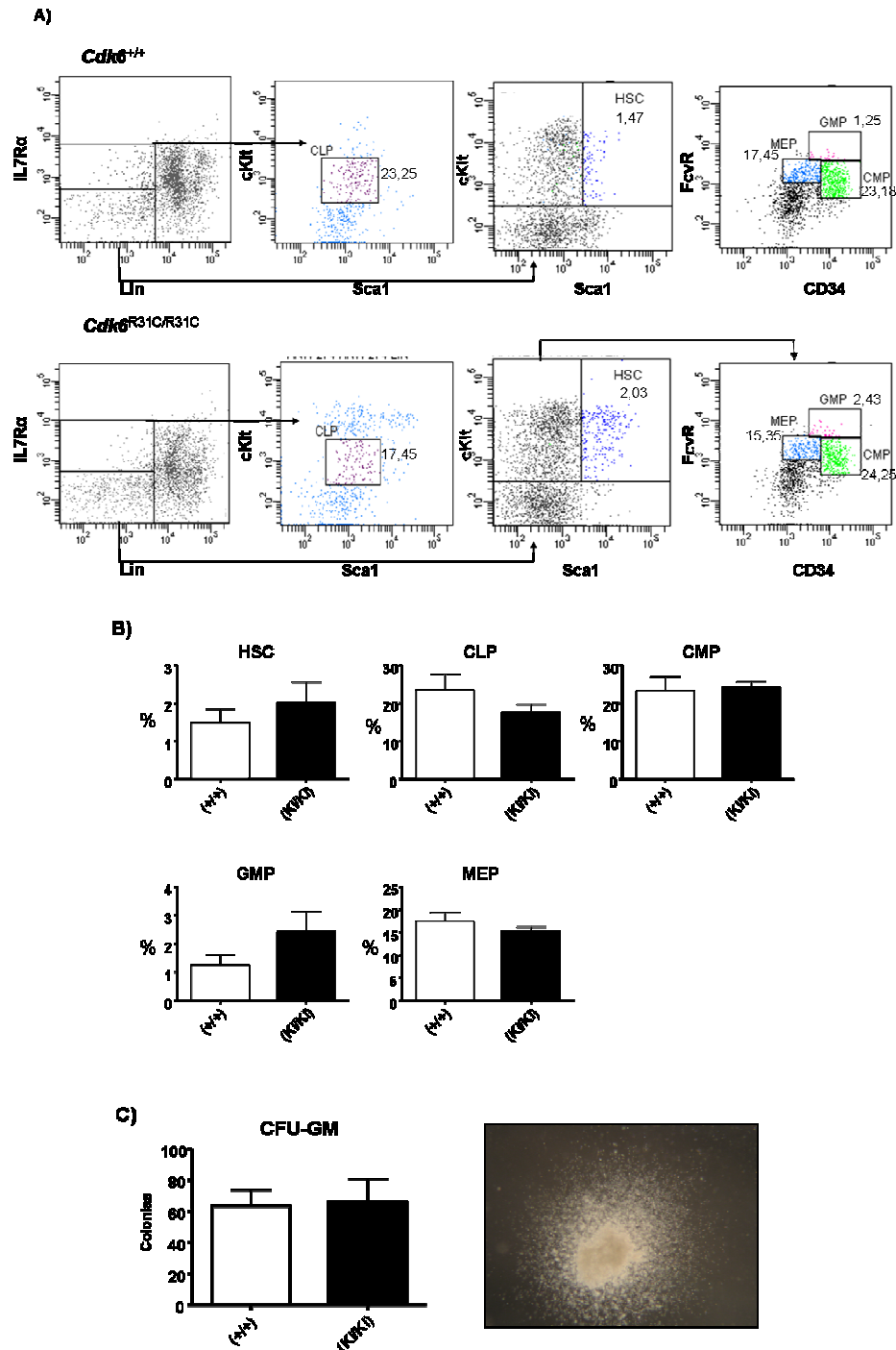


Figura 18: Análisis de los precursores hematopoyéticos inmaduros en ratones $Cdk6^{R31C/R31C}$ y $Cdk6^{+/+}$ jóvenes. A) Tinción para poblaciones de células madre hematopoyéticas (HSC: *hematopoietic stem cells*), células progenitoras mieloides (CMP: *common myeloid progenitors*), progenitores de granulocitos y macrófagos (GMP: *granulocyte – macrophage progenitors*) y progenitores de megacariocitos y eritrocitos (MEP: *megakariocytes – erythrocytes progenitors*) en médula ósea de ratones de 10 semanas de edad, de genotipos $Cdk6^{+/+}$ (N=4) y $Cdk6^{R31C/R31C}$ (N=4). Se muestra el porcentaje relativo de cada población. B) Histogramas con la cuantificación de las medias para cada genotipo con la desviación estándar. C) Histogramas con la cuantificación del ensayo de formación de colonias en metilcelulosa para cada genotipo, con un ejemplo de la apariencia de una unidad formadora de colonias de granulocitos y macrófagos.

El análisis de sangre periférica de animales jóvenes (10 semanas), no muestra diferencias significativas en las principales poblaciones sanguíneas maduras (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas), así como tampoco en algunas poblaciones específicas de glóbulos blancos como los linfocitos.

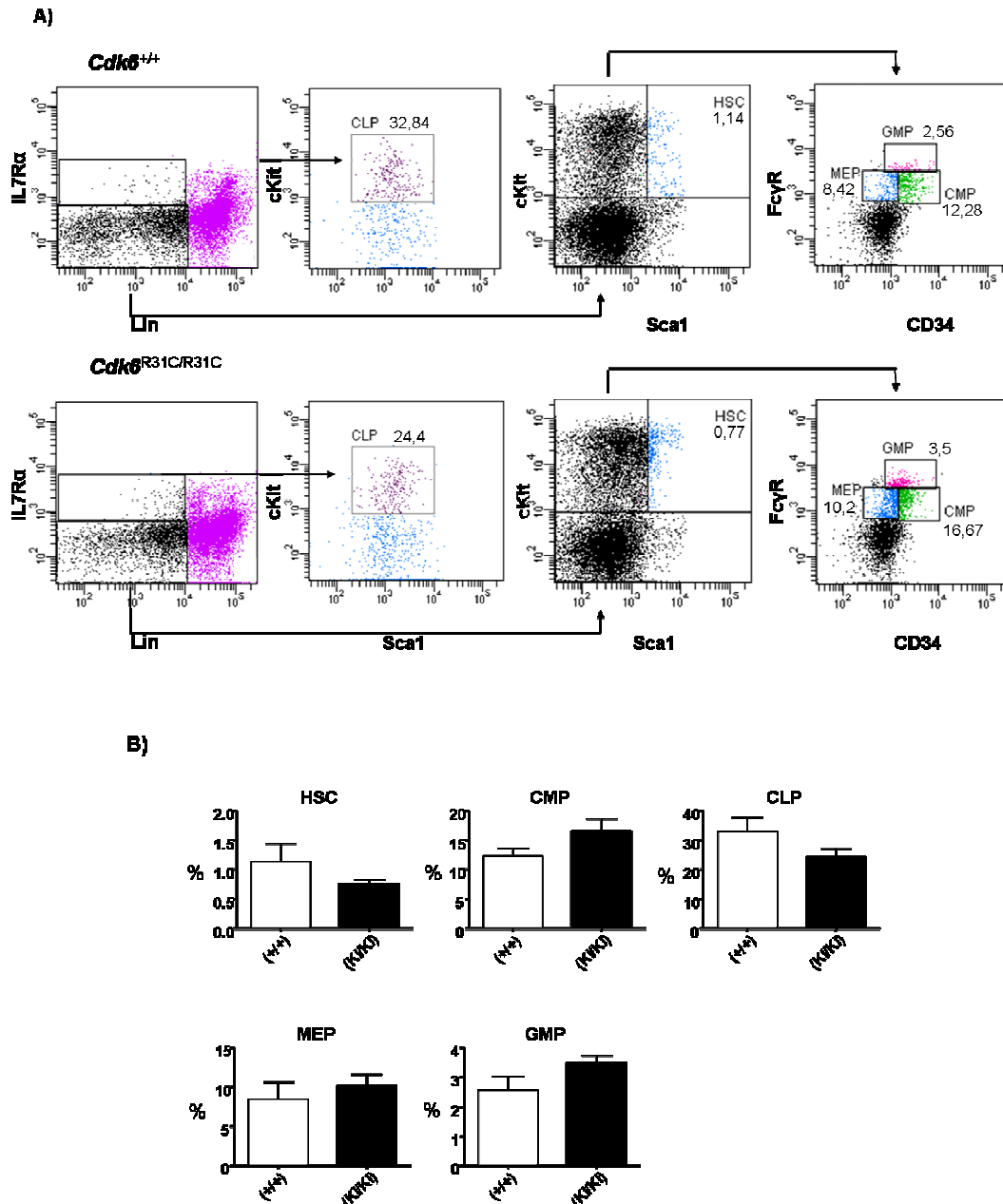


Figura 19: Análisis de los precursores hematopoyéticos inmaduros en ratones *Cdk6^{R31C/R31C}* y *Cdk6^{+/+}* adultos. A) Tinción para poblaciones de células madre hematopoyéticas (HSC: *hematopoietic stem cells*), células progenitoras mieloides (CMP: *common myeloid progenitors*), progenitores de granulocitos y macrófagos (GMP: *granulocyte – macrophage progenitors*) y progenitores de megacariocitos y eritrocitos (MEP: *megakariocytes – erythrocytes progenitors*) en médula ósea de ratones de 10 semanas de edad, de genotipos *Cdk6^{+/+}* (N=5) y *Cdk6^{R31C/R31C}* (N=3). Se muestra el porcentaje relativo de cada población. B) Histogramas con la cuantificación de las medias para cada genotipo con la desviación estándar.

En ratones adultos de más de 80 semanas de edad, no se observaron diferencias significativas entre los ratones *Cdk6*^{R31C/R31C} y los ratones silvestres en las poblaciones de células madre hematopoyéticas, células progenitoras linfoides, células progenitoras de megacariocitos y eritrocitos, células progenitoras mieloides y células progenitoras de granulocitos y macrófagos, aunque al igual que en el caso de los animales de 10 semanas, en los ratones *Cdk6*^{R31C/R31C}, se puede apreciar, en general, un ligero incremento de todos los progenitores, con excepción de las células progenitoras de la línea linfóide y en las células madre hematopoyéticas (Figura 19 A y B).

4.2.1. Timo y bazo en ratones jóvenes.

Los ratones mutantes *Cdk6*^{R31C/R31C} presentan una reducción en las células inmaduras y dobles negativas (DN) CD4⁻ CD8⁻ y un ligero incremento en las células dobles positivas (DP) CD4⁺ CD8⁺ y en las simples positivas para CD8⁺. Para determinar el efecto de la mutación *Cdk6* R31C en estadios tempranos de desarrollo de los timocitos de manera más precisa, también se comprobó la expresión de los marcadores CD44 y CD25 en la población de timocitos DN. Los ratones *Cdk6*^{R31C/R31C} presentan un incremento significativo del 47% en la población DN4 de timocitos, caracterizada por la expresión de CD25 y la ausencia de CD44 (Figura 20). Como consecuencia, los otros estadios de DN (DN1-DN3) se encuentran en menor proporción.

Seguidamente, se analizó si la expresión del alelo *Cdk6* R31C confería un incremento en el potencial proliferativo de estos timocitos. Como se muestra en la Figura 20, los timocitos aislados de timo ratones *Cdk6*^{R31C/R31C} de 8 semanas de edad muestran un incremento en la capacidad proliferativa comparado con los aislados de ratones normales. Este incremento de proliferación de timocitos también es evidente mediante análisis de las poblaciones, marcadas con ioduro de propicio, por citometría de flujo.

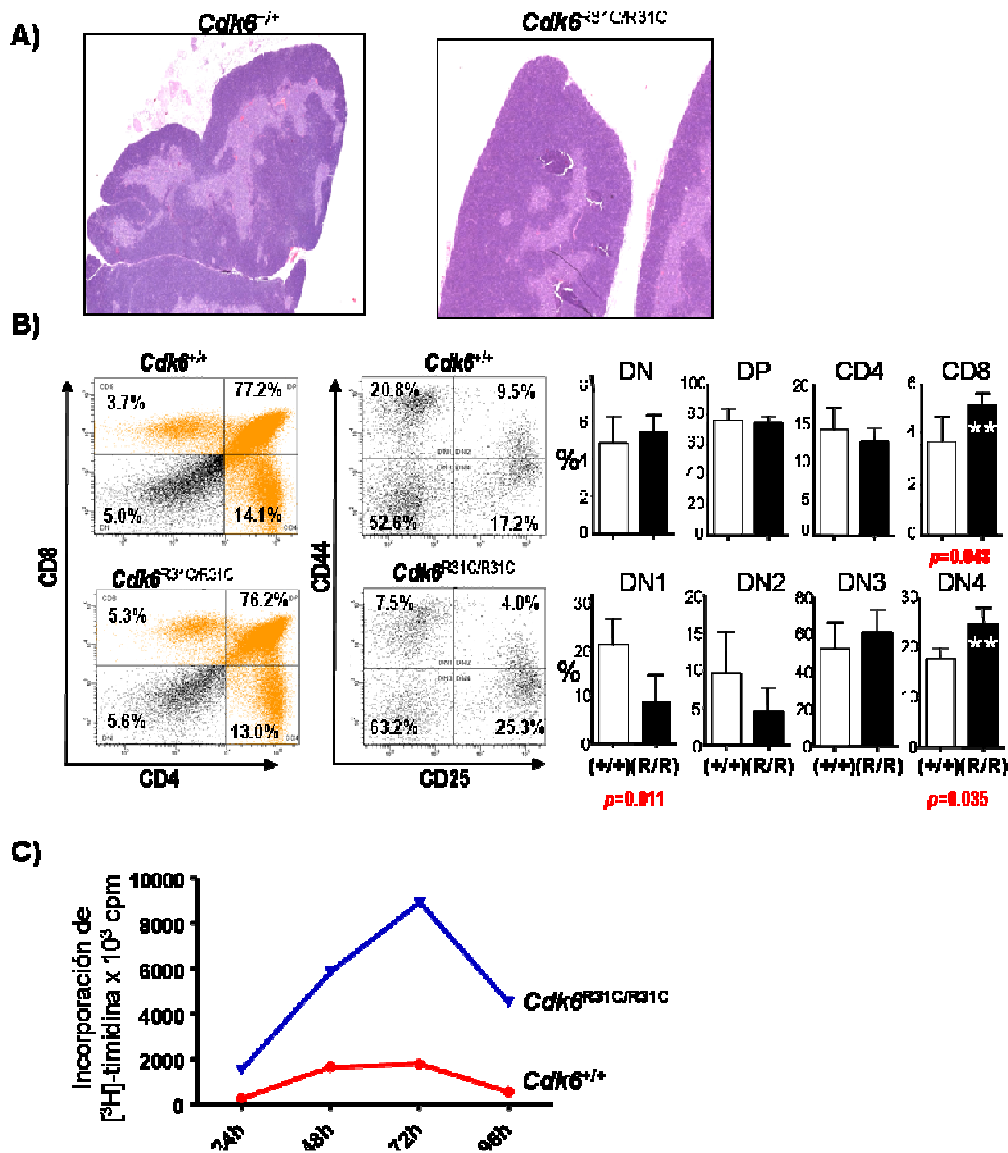


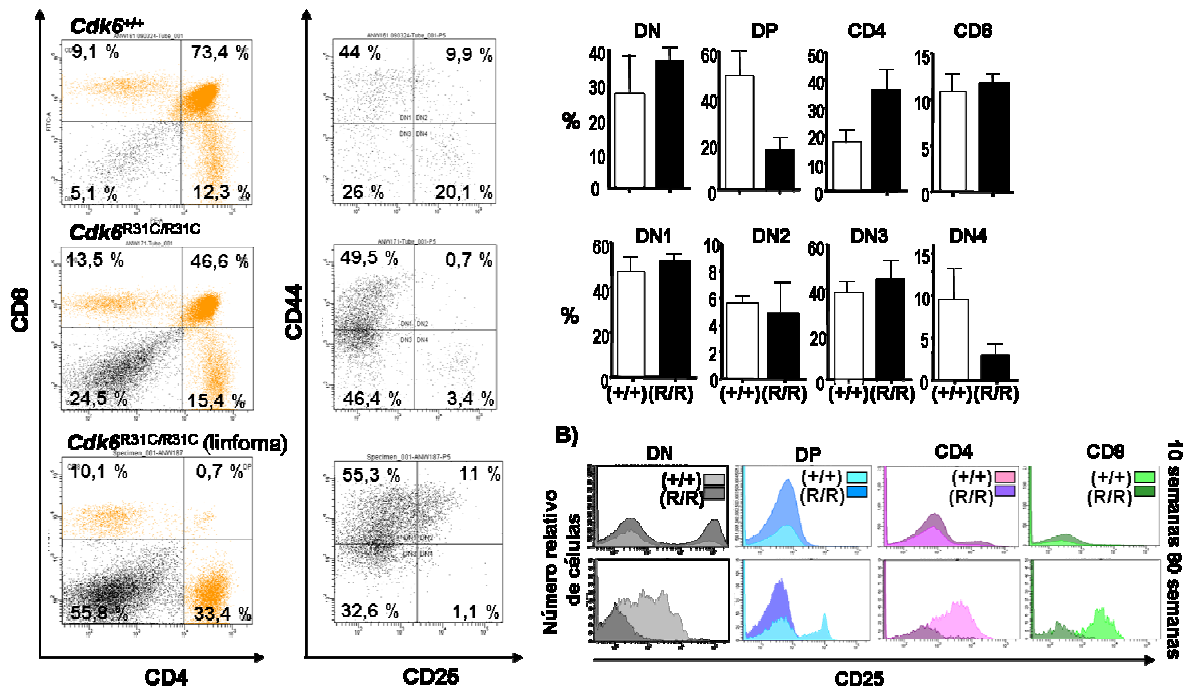
Figura 20: Defectos en el desarrollo de linfocitos T en ratones *Cdk6*^{R31C/R31C}. A) H & E (hematoxilina – eosina) de secciones de timo que muestran hiperplasia de células T en la corteza del timo de ratones *Cdk6*^{R31C/R31C}. B) Tinción para células DN (dobles negativas), DP (dobles positivas), CD4⁺, CD8⁺, DN1-DN4 (dobles negativas 1-4) en timos de animales de 10 semanas de edad de genotipos *Cdk6*^{+/+} y *Cdk6*^{R31C/R31C}. C) Linfocitos de *Cdk6*^{+/+} y *Cdk6*^{R31C/R31C} en fase S en los tiempos indicados después de la estimulación con PMA e ionomicina.

4.2.2. Timo y bazo en ratones adultos

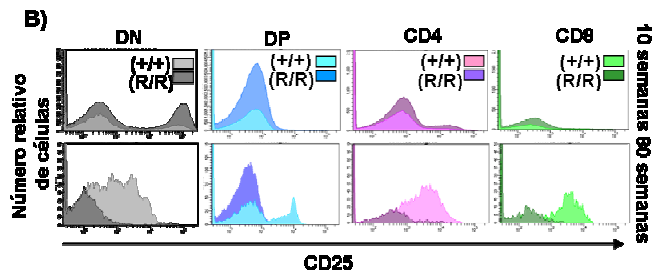
Las alteraciones en el desarrollo de las células T en animales jóvenes, da lugar a graves variaciones en los animales más adultos. Los ratones *Cdk6*^{R31C/R31C} de 20 meses de edad manifiestan una dramática reducción en las células DP y un incremento en las células DN y CD4⁺. Estas células DN son células inmaduras (DN1-DN3) y mayoritariamente negativas para CD25 (Figura 21). Este fenotipo está

acompañado por un incremento significativo del número de linfocitos en sangre periférica (Figura 21 D)

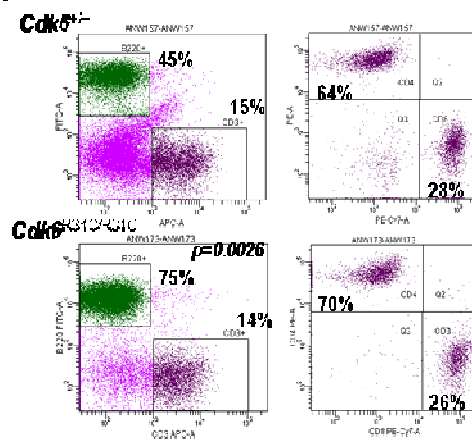
A)



B)



C)



D)

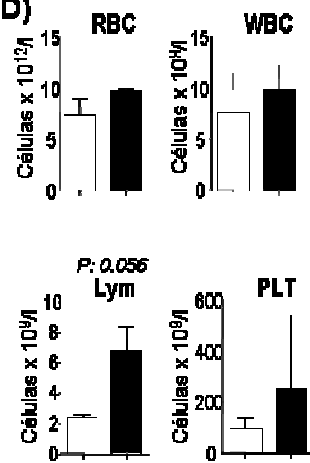


Figura 21: Desarrollo alterado de linfocitos T en ratones *Cdk6*^{R31C/R31C} adultos. A) Tinción para células DN (dobles negativas), DP (dobles positivas), CD4+, CD8+, DN1-DN4 (dobles negativas 1-4) en timos de animales de 80 semanas de edad de genotipos *Cdk6*^{+/+} y *Cdk6*^{R31C/R31C}. B) Ejemplo de análisis por citómetro de flujo de la expresión de CD25 en las poblaciones DN, DP, CD4+ y CD8+ de timocitos que proceden de ratones *Cdk6*^{+/+} y *Cdk6*^{R31C/R31C} jóvenes (10 semanas) y adultos (80 semanas). C) Ejemplo de tinción para células T y B del bazo de ratones adultos de genotipos *Cdk6*^{+/+} y *Cdk6*^{R31C/R31C}. D) Análisis de sangre periférica de ratones de genotipos *Cdk6*^{+/+} y *Cdk6*^{R31C/R31C}. Los histogramas muestran la cuantificación de glóbulos rojos (RBC: red blood cells), glóbulos blancos (WBC: white blood cells), linfocitos (Lym: lymphocytes) y plaquetas (PLT: platelets).

4.3. Análisis en ratones dobles *knock in*: *Cdk4*^{R24C}; *Cdk6*^{R31C}

Para obtener ratones completamente insensibles a los inhibidores de la familia INK4, se cruzaron ratones de genotipo *Cdk6*^{R31C/R31C} con ratones de genotipo *Cdk4*^{R24C/R24C}. Los ratones totalmente insensibles a los inhibidores de la familia INK4, es decir *Cdk6*^{R31C/R31C}; *Cdk4*^{R24C/R24C} son letales embrionarios tardíos en el desarrollo embrionario (Figura 22). Si se analiza la viabilidad de estos embriones, se observa que siguen la proporción o ratio mendeliano esperado, hasta día 17,5 de desarrollo embrionario. Hasta ahora, no hemos conseguido obtener ningún embrión de mayor edad.

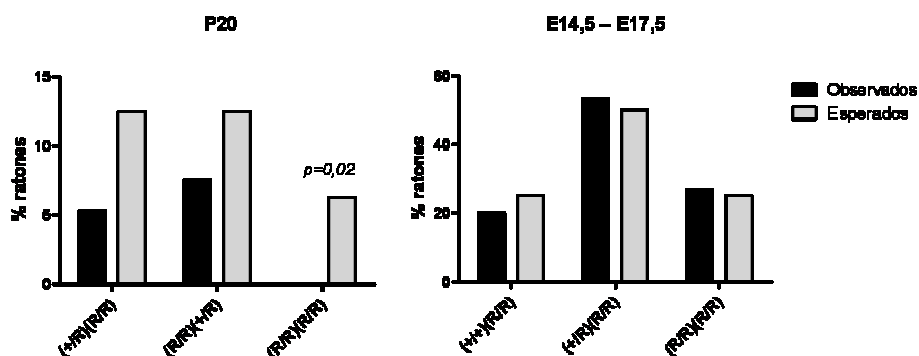


Figura 22: Histogramas con la representación del porcentaje de ratones o embriones de cada genotipo. Todos los ratones de P20 (día 20 después del parto) provienen de cruces entre ratones heterocigotos *Cdk6*^{R31C}; *Cdk4*^{R24C}, el resultado de letalidad embrionaria fue confirmado mediante el test de Fischer, con un valor de $p=0,02$. Los embriones E14,5 – E17,5 (de días entre 14,5 y 17,5 de desarrollo embrionario) provienen de cruces entre ratones de genotipos *Cdk6*^{R31C}; *Cdk4*^{R24C}. Los ratones esperados se calcularon siguiendo las leyes mendelianas. Para P20, partimos de una población de $N=200$; Para E14,5 – E17,5 $N=15$.

Para determinar las razones de la ausencia de viabilidad de los ratones dobles mutantes, seleccionamos embriones de día E16,5 derivados de cruces entre *Cdk6*^{R31C/R31C}; *Cdk4*^{R24C}. El análisis histológico de los embriones con genotipo *Cdk6*^{R31C/R31C}; *Cdk4*^{R24C/R24C}, muestra que presentan una estructura y tamaño normales, comparados con embriones silvestres. Todos los tejidos examinados presentan niveles normales de células positivas para BrdU, aunque un análisis detallado de la estructura del hígado fetal nos revela la presencia de una organización aberrante y distinta a la de un hígado de un embrión silvestre, con una estructura áltamente vacuolizada y un incremento en el número de eritroblastos o precursores nucleados de los eritrocitos (Figura 23 A). Además, se observa una acusada disminución en el número de células positivas para la mieloperoxidasa (MPO, marcador de la línea mieloide), mientras que no se observan diferencias en el número de células positivas para Ter119 (marcador de la línea eritroide) (Figura 23 B).

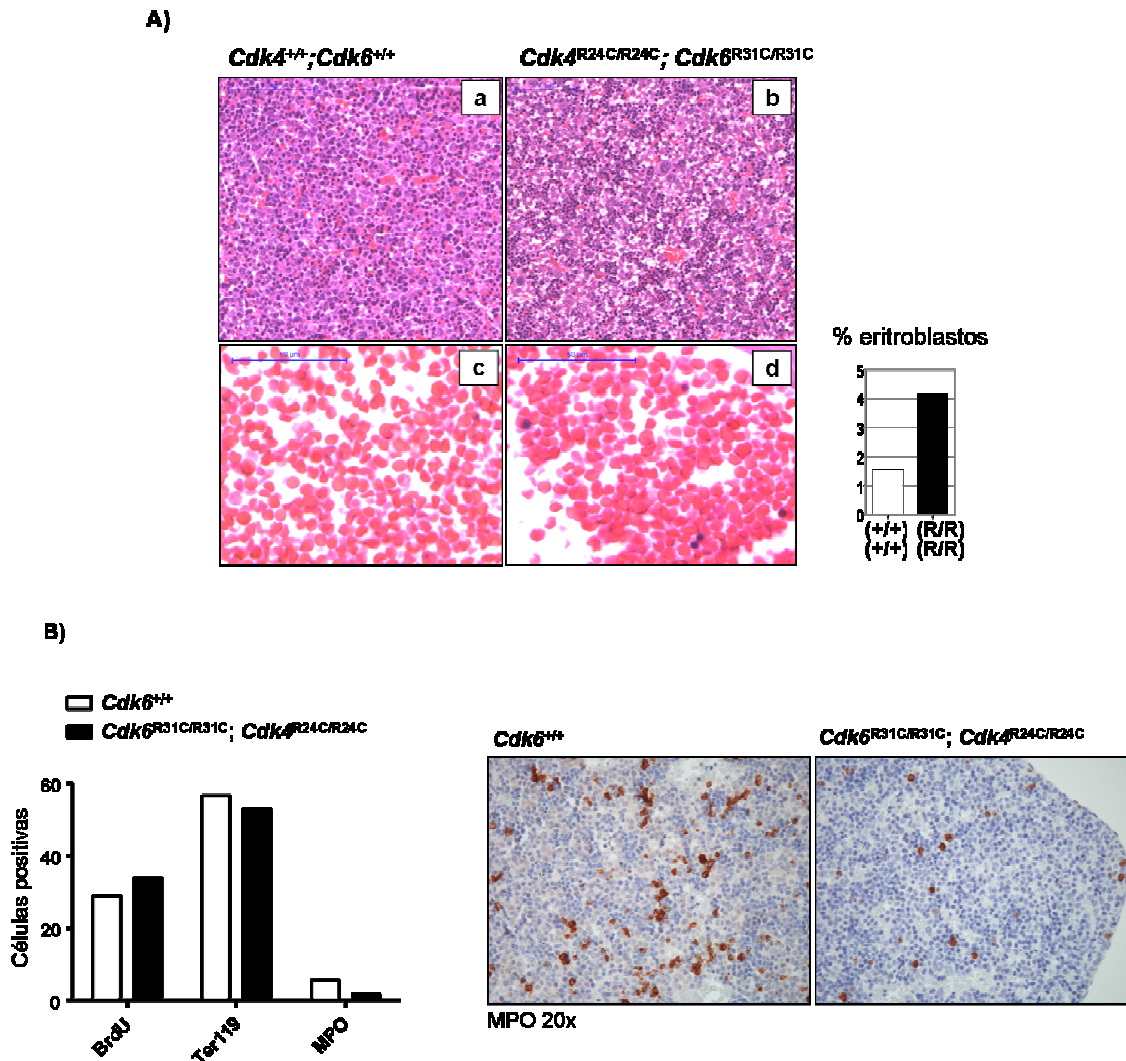


Figura 23: Alteraciones en el hígado fetal en embriones de día 16,5 de desarrollo embrionario. A) Cortes histológicos de hígado fetal teñidos con hematoxilina – eosina de embriones silvestres (a) y dobles mutantes (b), con detalle de vaso sanguíneo del hígado, mostrando un defecto en la morfología de los eritrocitos de los embriones dobles mutantes (d), comparados con los silvestres(c). Se muestra la cuantificación del porcentaje de eritroblastos frente al total de eritrocitos (N>2000). B) Identificación mediante inmunohistoquímica de proliferación celular (BrdU), población eritroide (Ter119) y población mieloide (MPO) del hígado fetal (izquierda) (N: 300-500). Se muestra un detalle de una sección representativa de hígado fetal teñida con MPO (derecha).

Para comprender el origen de estas anomalías hematopoyéticas, se analizaron los niveles de las células madre hematopoyéticas, así como de otros progenitores en el hígado fetal de embriones silvestres y dobles mutantes de día 13,5 de desarrollo embrionario. No se observaron diferencias significativas en los niveles relativos de células madre hematopoyéticas, aunque cabe destacar un acusado incremento en la población de células precursoras de la línea linfóide de los embriones *Cdk6*^{R31C/R31C};

$Cdk4^{R24C/R24C}$ en relación con los controles silvestres. Es interesante mencionar que este incremento también se observa en los embriones con genotipo $Cdk6^{R31C/R31C}$ (Figura 24).

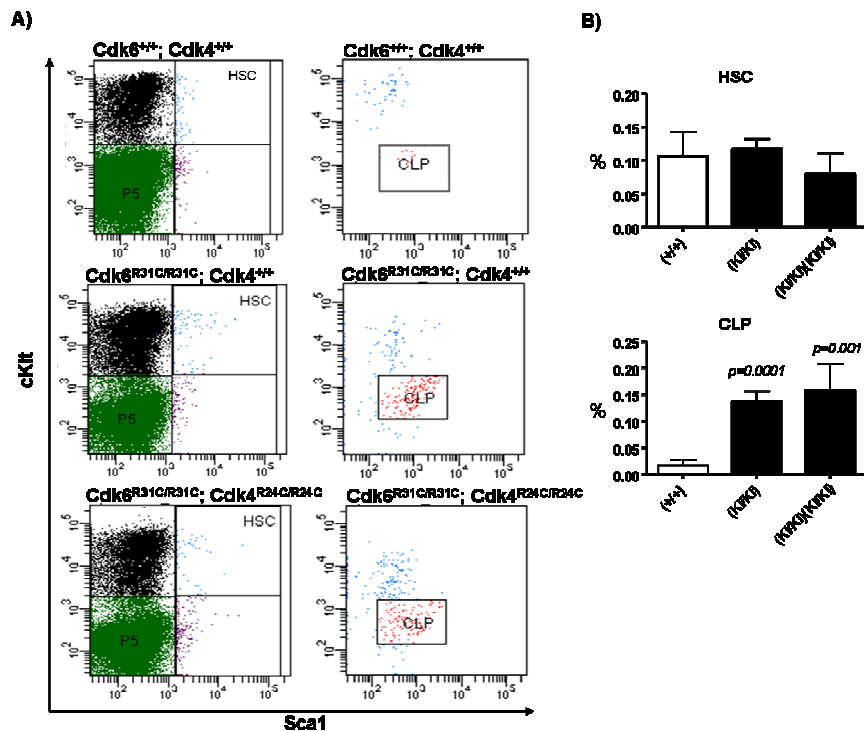


Figura 24: Incremento de los precursores hematopoyéticos de la línea linfóide en hígado fetal de embriones de día 13,5 de desarrollo embrionario, con genotipo $Cdk6^{R31C/R31C}$; $Cdk4^{R24C/R24C}$. A) Ejemplo de tinción para poblaciones de células madre hematopoyéticas (HSC) y para progenitores comunes de la línea linfóide (CLP). B) Cuantificación del porcentaje de células de la población de células madre hematopoyéticas y de los progenitores comunes de la línea linfóide.

Para analizar el potencial proliferativo de estos precursores, realizamos un ensayo funcional de formación de colonias en metilcelulosa. Para ello empleamos el medio completo descrito anteriormente. No se obtuvieron diferencias importantes en la proliferación de las células progenitoras que dan lugar a las unidades formadoras de colonia de granulocitos y macrófagos (CFU-GM), pero se obtuvieron grandes diferencias en el potencial proliferativo de los progenitores del hígado fetal que dan lugar a las unidades formadoras de colonias de granulocitos, macrófagos, células eritroides y megacariocitos (CFU-GEMM). En el caso de embriones con genotipos $Cdk6^{R31C/R31C}$; $Cdk4^{R24C/R24C}$, $Cdk6^{R31C/R31C}$; $Cdk4^{+/R24C}$ y $Cdk6^{+/R31C}$; $Cdk4^{R24C/R24C}$ no se obtuvieron prácticamente colonias. En cambio, a partir del hígado fetal de embriones silvestres se pudieron observar colonias en todas las muestras (Figura 25).

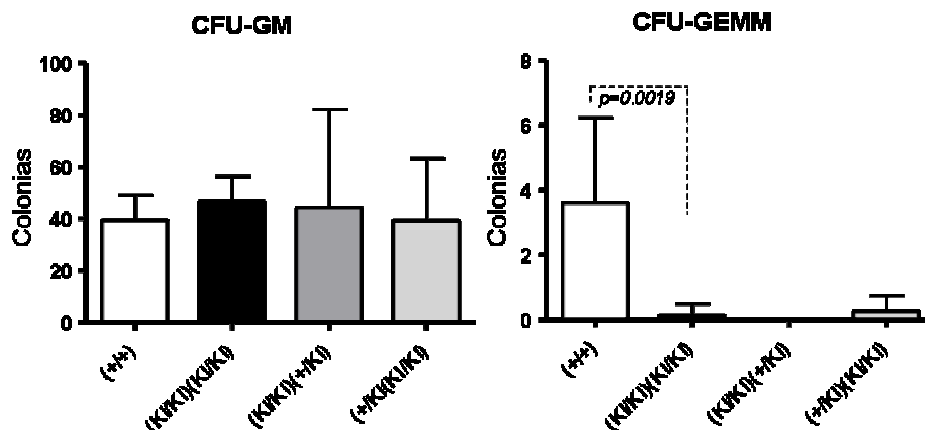


Figura 25: Alteraciones funcionales de las células progenitoras de la serie eritroide en embriones de genotipo $Cdk6^{R31C/R31C}$; $Cdk4^{R24C/R24C}$. CFU-GM: unidades formadoras de colonia de granulocitos y macrófagos; CFU-GEMM: unidades formadoras de colonia de granulocitos, células eritroides, macrófagos y megacariocitos. Se utilizaron hígados fetales de embriones de día 13,5 de desarrollo embrionario de genotipos $Cdk6^{+/+}$ (N=6), $Cdk6^{R31C/R31C}$, $Cdk4^{R24C/R24C}$ (N=4), $Cdk6^{R31C/R31C}$; $Cdk4^{+/R24C}$ (N=2); $Cdk6^{+/R31C}$; $Cdk4^{R24C/R24C}$ (N=2).

4.5. Generación de ratones condicionales para la deficiencia de NuMA.

Con el objeto de analizar la función y las implicaciones que tiene la ausencia de NuMA en el ciclo celular, en concreto en la formación del huso mitótico y su relación con las divisiones asimétricas, y dado que su función está caracterizada principalmente en *Drosophila* y *C.elegans* y no está claramente definida en mamíferos, se generó un ratón condicional para la ausencia de NuMA, mediante la inserción de un vector retroviral *gene trap*, que se detalla a continuación.

El vector de *gene trap* que se empleó para la generación de los ratones, FlipRosa β geo, es un vector retroviral condicional que contiene un sitio de empalme o *splice acceptor* (SA), la fusión de los genes β galactosidasa y neomicina (β geo) y una señal de poliadenilación, todo ello en un *cassette* insertado en la estructura del vector, el cual carece de promotores y potenciadores (Friedrich and Soriano, 1991) (Figura 26)



Figura 26: Vector retroviral *gene trap* FlipRosa β geo. Los sitios marcados con triángulos, frt (amarillo), f3 (verde), loxP (rojo) y lo511 (rosa), son secuencias de reconocimiento de las recombinasas Flp y Cre; LTR (*long terminal repeat*); SA (*splice acceptor*); β geo (fusión de los genes β galactosidasa y neomicina); pA (señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina)

Este vector condicional, usa dos sistemas de recombinación, por un lado el de la recombinasa Flp, que reconoce los sitios frt y f3, y por otro el de la recombinasa Cre, que reconoce los sitios loxP y lox511. Esto permite al *cassette* del *gene trap* que se invierta desde la forma codificante o con sentido a la forma no codificante o antisentido y a la inversa. De esta manera, la inactivación del gen, una vez microinyectadas las células madre en blastocistos de ratón puede ser reactivada en momentos específicos y en tejidos específicos y viceversa, si partimos de un ratón con la mutación inactivada (ratón condicional), se podría activar la mutación posteriormente (Figura 27)

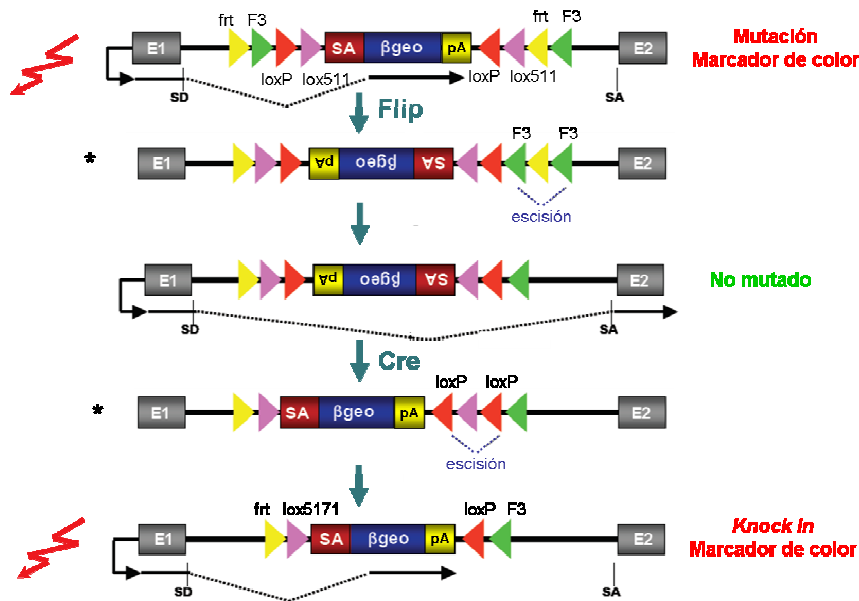


Figura 27: Inactivación de NuMA mediante el cassette SAβgeopA. El esquema muestra el *cassette* flanqueado por sitios diana para las recombinasas. En este caso, siguiendo la configuración Flex, una vez que se ha integrado en el intrón de un gen expresado. Los transcritos (flechas negras) que se inician desde el promotor endógeno, se unen desde el sitio donador (SD) del exón endógeno (exón 1), hasta el sitio de empalme o aceptor (SA) del cassette SAβgeopA. De esta manera, el gen reportero βgeo se expresa y el transcritor endógeno se termina prematuramente en la secuencia pA, causando la mutación. Posteriormente, la recombinasa Flp invierte el *cassette* y lo convierte en no codificante, reconociendo los sitios frt o f3 (no mostrado en la figura) y escindiendo simultáneamente la secuencia que se encuentra entre los sitios f3 con la misma orientación. De esta manera el *cassette* se bloquea ante nuevas reinversiones, ya que los sitios frt y f3 que permanecen no pueden recombinar. Esta inversión reactiva la transcripción normal del gen, reparando la mutación. Posteriormente, la recombinasa Cre es capaz de invertir de nuevo el *cassette* hacia la posición codificante, reinduciendo de esta manera la mutación.

* Es importante destacar que existen productos generados transitorios que se transforman inmediatamente en productos estables.

En nuestro caso, el clon de células ES con fondo genético [129S2/SvPas] y con la inserción del vector condicional descrito anteriormente en el intrón 1 del gen NuMA (clon número: P089E07, *German Gene Trap Consortium*), se microinyectó y agregó,

en paralelo, en blastocistos y mórulas de ratón, respectivamente. Como todos los genes que han sido “atrapados” tienen que estar expresados en células ES (Skarnes et al., 2004), lo primero que hicimos fue comprobar mediante RT-PCR que el transcrito estaba presente en estas células ES. Para ello, se extrajo el ARN de las células ES, se transformó a ADNc mediante una reacción de transcripción reversa y con el uso de oligos específicos del exón 1 y de la región de gen β galactosidasa, se realizó una PCR para confirmar la inserción del vector en el intrón 1 (Figura 28)

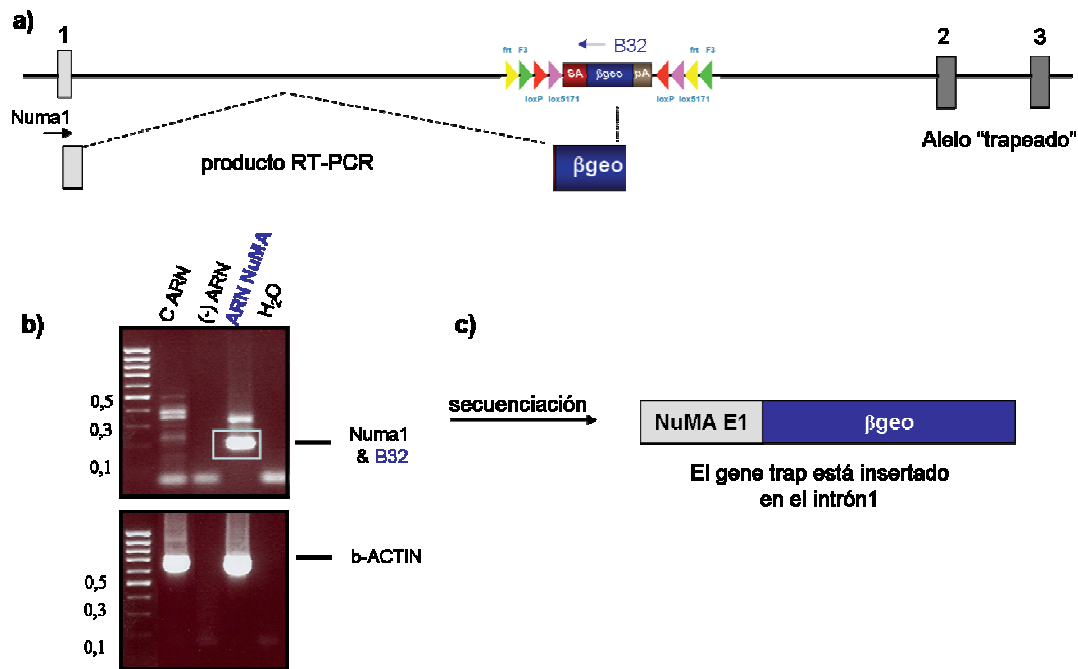


Figura 28: RT-PCR para confirmar la inserción del vector FlipRosa β geo en el intrón 1 del gen NuMA. a) Los oligos empleados son NuMA1 como directo y B32 como inverso. b) El gel de agarosa muestra la banda obtenida después de la RT-PCR a partir del ARN del clon de células ES. c) La banda positiva se aisló del gel, se purificó, se clonó en un vector intermediario (pCR4-TOPO, Invitrogen) y se secuenció.

Como resultado de la reacción de RT-PCR específica y posterior secuenciación de dicho producto, se confirmó la presencia del vector *gene trap* en el intron 1 de la secuencia genómica de NuMA.

Como ya se ha comentado, la inserción del vector retroviral se produce al azar. Para poder genotipar los ratones generados, necesitamos conocer con exactitud la localización de dicho vector, y por lo tanto, la secuencia que flanquea su lugar de inserción. Con este fin, y puesto que el tamaño del intrón 1 del gen NuMA es de 43 kb aproximadamente, con lo cual resulta muy difícil secuenciar todo el intrón, lo que hicimos fue aplicar la técnica del paseo cromosómico (Richard et al., 2008). Mediante el uso de esta técnica, basada en PCRs con oligos específicos de nuestro gen y oligos

de una secuencia conocida que se incluye en los extremos de los fragmentos de ADN previamente digeridos (v. Materiales y Métodos), obtuvimos las secuencias que flanquean el sitio de inserción del vector. Con este resultado, pudimos concluir que la inserción se había producido en el intrón 1, a 37 kb del exón 1 y a 6 kb del exón 2 (Figura 29)

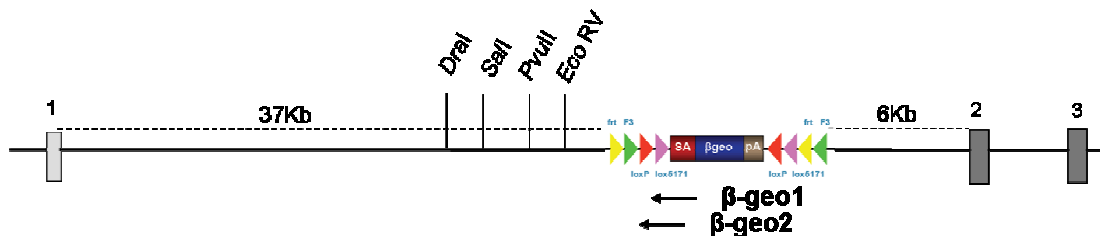


Figura 29: Localización del vector FlipRosaβgeo en el intrón 1 de NuMA. Las enzimas de restricción utilizadas para generar las librerías son *DraI*, *SalI*, *PvuII* y *EcoRV*. Se indica la situación de los oligos específicos de NuMA empleados en las reacciones de PCR (β-geo1 y β-geo 2). Los cuadrados de color gris claro representan a los exones no codificantes y los de color gris oscuro, a los exones codificantes.

Se obtuvieron animales quiméricos para NuMA mediante la técnica de microinyección de células ES sobre blastocistos y de agregación de células ES sobre mórulas. Se utilizaron blastocistos de fondo genético C57BL/6J, de color negro y mórulas de fondo genético CD1, de color blanco, puesto que las ES utilizadas eran de fondo genético 129/SvPas, con pelaje *agoutí* (v. Materiales y Métodos).

Las quimeras se pusieron en cruce con ratones C57BL/6J o CD1, según corresponda, para generar animales heterocigotos para NuMA. En primer lugar, se determinó por el pelaje de las crías, si el quimerismo estaba presente en la línea germinal, puesto que como las células que provienen de las ES mutantes son del fondo 129/SvPas, darán lugar a animales completamente *agoutí*.

Dado que el quimerismo en estos animales está en heterocigosis para NuMA, tan solo la mitad de las crías pigmentadas contendrá el alelo *KI*. Para determinar la presencia de dicho alelo en las crías *agoutí*, se desarrolló una estrategia de genotipado por PCR, utilizando el ADN proveniente de las colas de los animales (v. Materiales y Métodos).

La eliminación de NuMA resultó ser letal embrionaria (Figura 30). Puesto que no encontramos embriones homocigotos para la mutación después de día 10.5 de desarrollo embrionario, procedimos a la extracción de embriones en estadios anteriores. De esta manera, pudimos concluir que los embriones en ausencia de NuMA eran capaces de llegar hasta día E6.5, es decir, una vez implantados en el útero materno y en las etapas tempranas a medias de gastrulación.

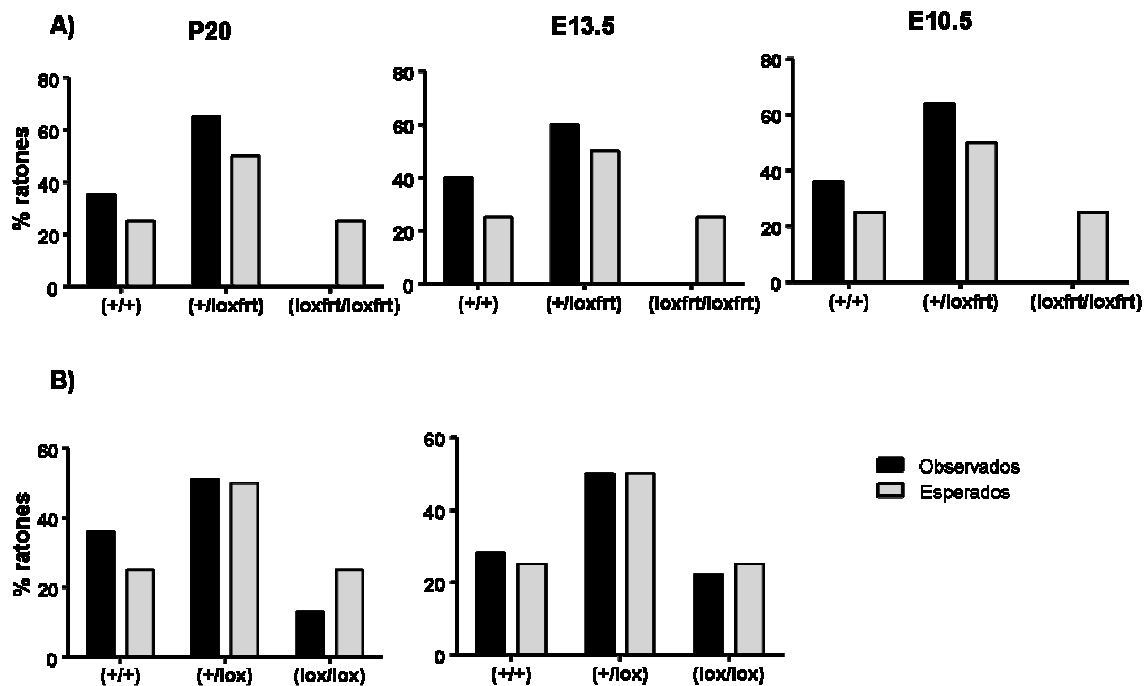


Figura 30: Histogramas con la representación del porcentaje de ratones o embriones de cada genotipo. A) Todos los ratones y embriones provienen de cruces entre heterocigotos (+/KI) x (+/KI) (A) ó (+/lox) x (+/lox) (B). P20: día 20 después del parto. E13,5 o 10,5: día 13,5 o 10,5 del desarrollo embrionario. Los ratones esperados se calcularon siguiendo las leyes mendelianas. Para P20, partimos de una población de N=200; Para E13,5 N=11; Para E10,5, N=25 (A) y P20, N=150; E13,5, N=24 (B).

Como nuestro modelo es condicional, lo que hicimos fue cruzar los animales heterocigotos para NuMA o que poseen un alelo loxfrt ($NuMA^{+/-loxfrt}$), ya que el *cassette* del *gene trap* se encuentra flanqueado por sitios de recombinación lox y frt, con ratones transgénicos que expresan la recombinasa Flip. Esta recombinasa es capaz de reconocer los sitios frt, que como en este caso se encuentran en una orientación opuesta (Figura 31), produce la inversión de toda la secuencia que está entre estos sitios. De esta manera y tal y como ya hemos explicado, la inversión del *cassette* provoca la anulación de la mutación y por lo tanto, la viabilidad del animal. En este caso, el alelo condicional se denomina lox, ya que solo posee los sitios lox flanqueando el *cassette* o frt si hemos utilizado en primer lugar la recombinasa Cre, que reconoce los sitios lox y por lo tanto sólo nos quedan los sitios frt flanqueando el *cassette* (Figura 32).

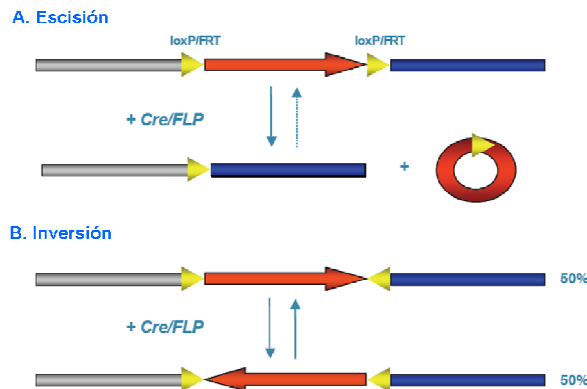


Figura 31: Sistemas de recombinación mediados por las recombinasas Cre y Flp. A. La escisión se produce cuando los sitios de reconocimiento de las recombinasas se encuentran en la misma orientación. B. La inversión se produce cuando los sitios de reconocimiento de las recombinasas se encuentran en orientación opuesta.

Los ratones condicionales para NuMA, $NuMA^{lox/lox}$, resultaron ser perfectamente viables, aunque se observó una ligera disminución en el porcentaje de ratones $NuMA^{lox/lox}$ obtenidos (Figura 30). Esto, junto con ciertas patologías específicas que se mostrarán posteriormente, nos demuestra que la expresión de NuMA de un ratón condicional es hipomórfica, con lo cual tenemos otra herramienta para el estudio y la caracterización de NuMA.

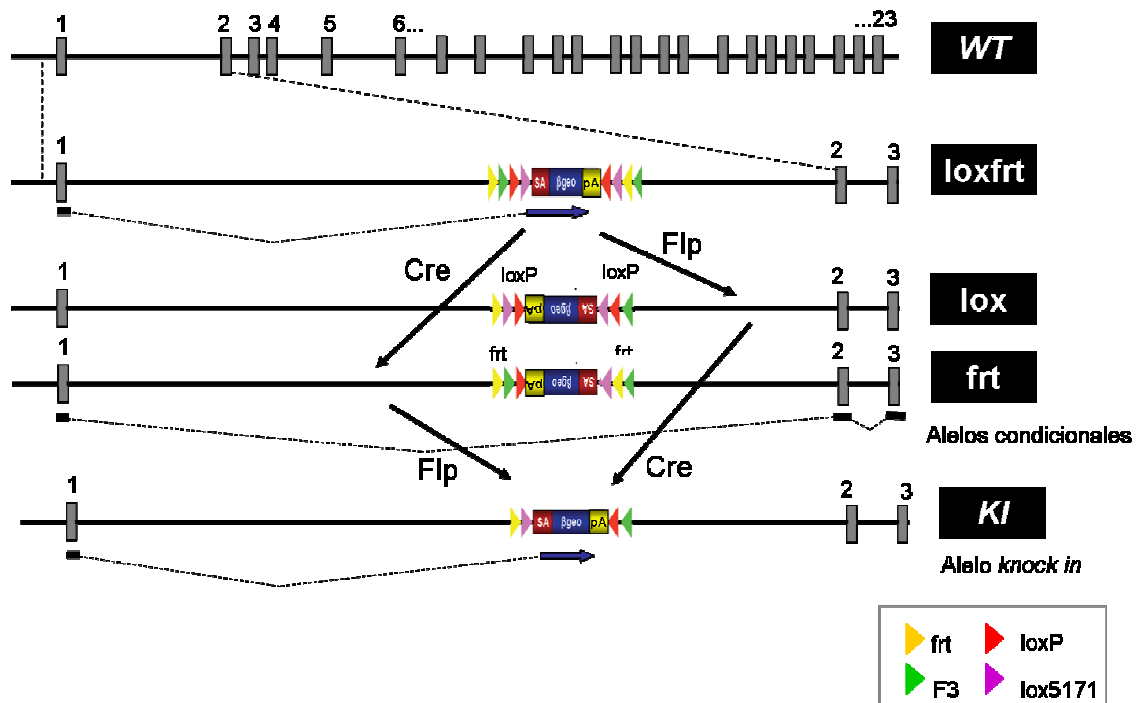


Figura 32: Posibles alelos y estrategia. El alelo WT (*wild type* o silvestre) de NuMA, posee 23 exones, representado por rectángulos grises. La inserción del gene trap en el intrón1 genera el alelo loxfrt. Posteriormente, tras la actuación de las recombinasas Cre o Flp, obtenemos los alelos condicionales lox o frt. En este punto, la mutación puede ser reactivada mediante Flp o Cre, y así obtenemos el alelo KI.

4.5. Efectos de la deficiencia de NuMA en desarrollo embrionario y regulación del ciclo celular.

La mayor parte de los estudios sobre el efecto de la eliminación de NuMA se han llevado a cabo en *Drosophila*. Debido a la ausencia de información en mamíferos, se realizó un estudio patológico exhaustivo de los órganos más importantes en el ratón, a distintas edades. Ya que los ratones en ausencia completa de NuMA son letales embrionarios, se analizaron ratones condicionales hipomórficos, y también ratones que provienen de cruces con otros animales transgénicos que expresan Cre bajo diversos promotores, y en los que por lo tanto la eliminación de NuMA se produce específicamente en ciertos tejidos. En este último caso, nos hemos centrado sobre todo en piel y sistema nervioso. La piel es uno de los tejidos en los que se producen divisiones asimétricas que, como ya hemos comentado, están asociadas con divisiones de orientación apical/basal. Este tipo de divisiones ya se habían observado en la epidermis en desarrollo hace tres décadas (Smart, 1970). Por otro lado, el sistema nervioso, formado por una gran diversidad de células, ha sido muy estudiado en *Drosophila*, donde se sabe que los progenitores del sistema nervioso se pueden dividir de forma simétrica y asimétrica, para renovarse y para producir células que se diferenciarán (Campos-Ortega, 1993; Doe and Technau, 1993).

Como ya se ha comentado, la ausencia de NuMA provoca letalidad embrionaria y los embriones son capaces de desarrollarse hasta día E6,5.

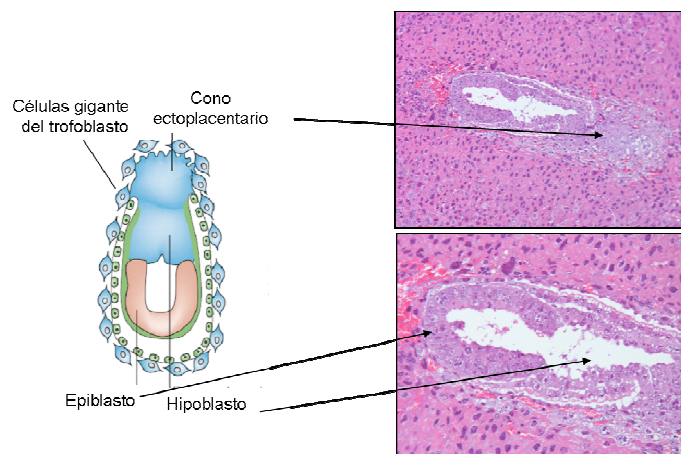


Figura 33: Esquema de las partes de un embrión de día 6 de desarrollo embrionario. El dibujo resalta las partes más importantes del embrión y mediante flechas se indica su correspondencia en una foto real de embriones de día 6,5 silvestres.

Una vez producida la fertilización, después de 4,5 días de desarrollo, el embrión se implanta en la pared uterina. La masa de células internas se divide en dos capas, una es el hipoblasto, que se encuentra próximo al blastocelo y da lugar al endodermo

primitivo (y posteriormente a la capa más externa del saco vitelino), y la otra capa es el epiblasto, que dará lugar a todas las células del embrión, lo que se considera formado por células pluripotentes e indiferenciadas (Gilbert and Merlet-Benichou, 2000; Hogan et al., 1994) (Figura 33). Posteriormente, a día 6 de desarrollo embrionario, existen tres tipos celulares diferenciados: el trofoblasto, el epiblasto y el endodermo primitivo. Durante la fase de gastrulación, el ectodermo embrionario se diferenciará en las tres capas germinales primarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. Es en este punto, en el que las células del epiblasto comienzan a diferenciarse, cuando se produce la letalidad del embrión en ausencia de NuMA.

Para analizar el aspecto de los embriones en dicho estadio, lo que hicimos fue aislar la decidua de las madres preñadas de día 6,5, y hacer cortes sucesivos de toda ella. Posteriormente, con el objeto de analizar los embriones que no expresaban NuMA, hicimos inmunohistoquímica para NuMA. Pudimos ver que todos los embriones negativos para NuMA, tenían un alto porcentaje de células apoptóticas si lo comparamos con embriones positivos para NuMA (Figura 34).

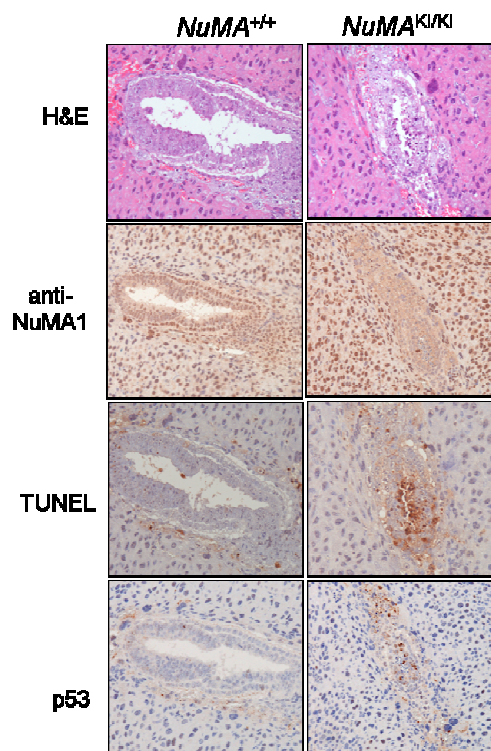


Figura 34: Cortes de embrión de día 6,5. Se comparan dos embriones control o positivos para NuMA y un embrión *KI* (*knock in*) para NuMA. Se emplearon las técnicas de tinción con hematoxilina/eosina (H&E), inmunohistoquímica para NuMA y p53 y TUNEL para detectar apoptosis.

Para analizar directamente las consecuencias de la eliminación de NuMA, y por lo tanto, de su acumulación en el huso mitótico sobre la proliferación celular, se

aislaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) a partir de ratones modificados genéticamente, condicionales para NuMA ($NuMA^{lox/lox}$), ya que como se ha indicado en el apartado anterior, los ratones en ausencia de NuMA tienen una letalidad muy temprana (E6,5) y no es posible obtener MEFs de estos animales, puesto que los fibroblastos se aíslan a día E13,5. En este caso, utilizamos ratones que procedían de cruces entre $NuMA^{lox/lox}$ y RERT-Cre. Estos últimos son ratones *knock in* que expresan Cre de manera inducible tras la administración de tamoxifeno (Mijimolle et al., 2005). Lo que se hizo fue mantener los fibroblastos en cultivo y añadir tamoxifeno al medio de cultivo, tres veces (v. Materiales y Métodos). Posteriormente, se cuantificó de la expresión de NuMA mediante inmunofluorescencia y utilizando el *software* de *Metamorph*. Los resultados nos muestran que la inversión del *cassette* no fue completa en todas las células, pero que la expresión de NuMA disminuyó de manera considerable y significativa (Figura 35)

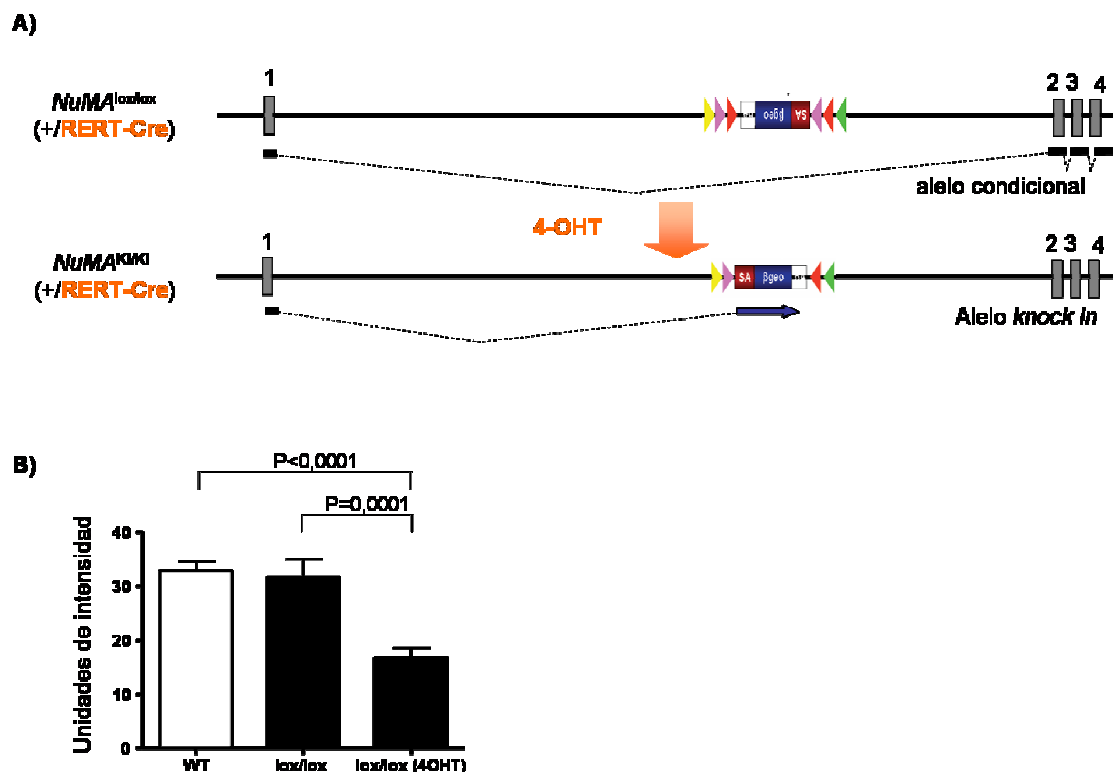


Figura 35: Tratamiento con tamoxifeno de MEFs. A) Estrategia del tratamiento. Cuando administramos 4-OHT (4-hidroxi-tamoxifeno) a las células condicionales para NuMA, el alelo se convierte en *knock in* por inversión del *cassette gene trap*. B) Cuantificación de la intensidad de expresión de NuMA mediante inmunofluorescencia.

Ya que el resultado no había sido del todo satisfactorio, se intentó eliminar la expresión de NuMA mediante infección de los MEFs condicionales para NuMA con vectores retrovirales que expresan Cre. En nuestro caso empleamos pBabe-puro-Cre y pBabe-puro-empty, éste último como control. Se realizó una curva de supervivencia

que nos indicó que las propiedades proliferativas en ausencia de NuMA no diferían demasiado de las de los MEFs control (Figura 36). Sin embargo, este resultado a pesar de que se repitió varias veces, no parece muy fiable, ya que tanto las células control como las condicionales para NuMA tras la infección con Cre, sufren un descenso proliferativo que se podría explicar por la toxicidad de la incorporación de un alto número de copias de la recombinasa Cre en el núcleo de las células, puesto que se sabe que puede tener efectos de reconocimiento de secuencia inespecíficas.

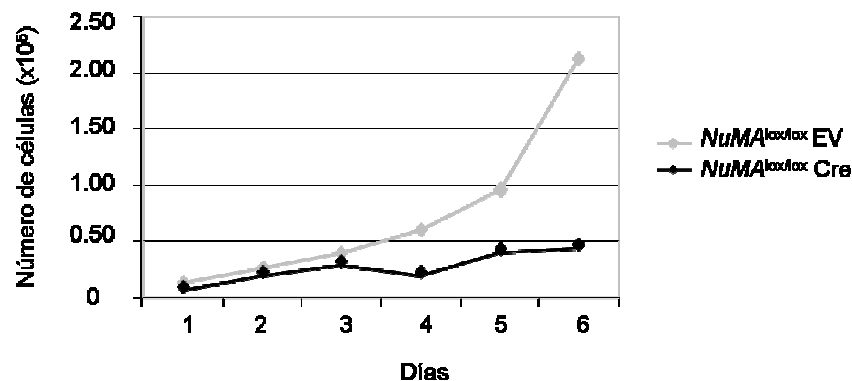


Figura 36: Curva de crecimiento de MEFs $NuMA^{lox/lox}$ infectados con vectores retrovirales que expresan Cre o controles. Las infecciones retrovirales se realizaron utilizando los siguientes vectores retrovirales: EV: *empty vector* o vector vacío como control (pBabe-puro-empty). Cre: vector que expresa Cre (pBabe-puro-Cre).

Se realizó paralelamente la immortalización de dichos MEFs, siguiendo el protocolo 3T3. En este caso, tampoco pudimos observar diferencias destacables entre el comportamiento de los MEFs condicionales para NuMA y el de los MEFs silvestres (datos no mostrados). Una vez obtuvimos los MEFs inmortales, realizamos varios ensayos para determinar si la pérdida de NuMA provocaba algún tipo de deficiencia o de retraso, concretamente en la fase de mitosis del ciclo celular. Existen estudios previos en los que, mediante microinyección de anticuerpos para NuMA se observa un retraso en el tiempo empleado para la fase de mitosis (Gaglio et al., 1995). Se analizó el tiempo empleado para mitosis de MEFs inmortales $NuMA^{lox/lox}$, previamente infectados con un vector retroviral que expresa Cre fusionado a GFP. Para ello, lo que hicimos fue grabar, empleando un microscopio con tecnología de cámara rápida (*time-lapse*), las células infectadas de los distintos genotipos durante 24 horas. Las células en las que se ha producido la infección de Cre, y por lo tanto la inversión del *cassette gene trap* y la eliminación de la expresión de NuMA, se ven verdes por la presencia de GFP. Así, pudimos medir el tiempo de mitosis específicamente en ausencia o no de NuMA (Figura 37).

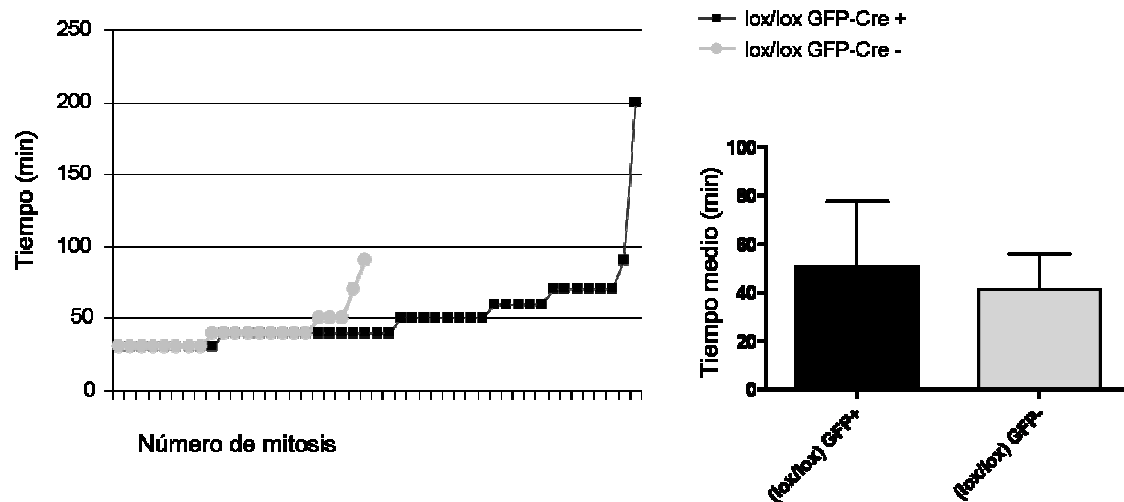


Figura 37: Duración de las mitosis en fibroblastos inmortales y $NuMA^{lox/lox}$; Cre. A) Cada punto se refiere a una mitosis, la duración de cada una viene indicado en el eje de las x. B) La media de la duración de todas las mitosis analizadas. GFP-Cre +: son las células positivas para la infección con pMx-GFP-Cre. GFP-Cre -: son las células negativas para la infección con pMx-GFP-Cre.

El resultado nos muestra que existe un pequeño retraso en el tiempo empleado para completar la fase de mitosis en ausencia de NuMA. La duración de mitosis se ha definido como el periodo de tiempo desde que la célula cambia a morfología redonda hasta que vuelve a su forma original y se une el sustrato.

La progresión hacia mitosis de células inmortales $NuMA^{\Delta/\Delta}$, presenta un retraso significativo con respecto a las $NuMA^{lox/lox}$. A pesar de que esa diferencia no es muy acusada, las células presentan importantes defectos en la formación del huso mitótico. Se hicieron inmunofluorescencias de los MEFs inmortales infectados con Cre. Hicimos una tinción conjunta de NuMA y α -tubulina de los microtúbulos del huso para poder ver su estructura y la presencia o ausencia de NuMA. La mayor parte de los defectos observados en las células con presencia de NuMA, ya sean $NuMA^{lox/lox}$ o $NuMA^{+/+}$, fueron husos con múltiples polos (Figura 38 A). En cambio, en el caso de las células en ausencia de NuMA, la mayor parte de los defectos observados fueron husos mitóticos aberrantes, con los polos desenfocados o sólo con un polo en otros casos (Figura 38 B)

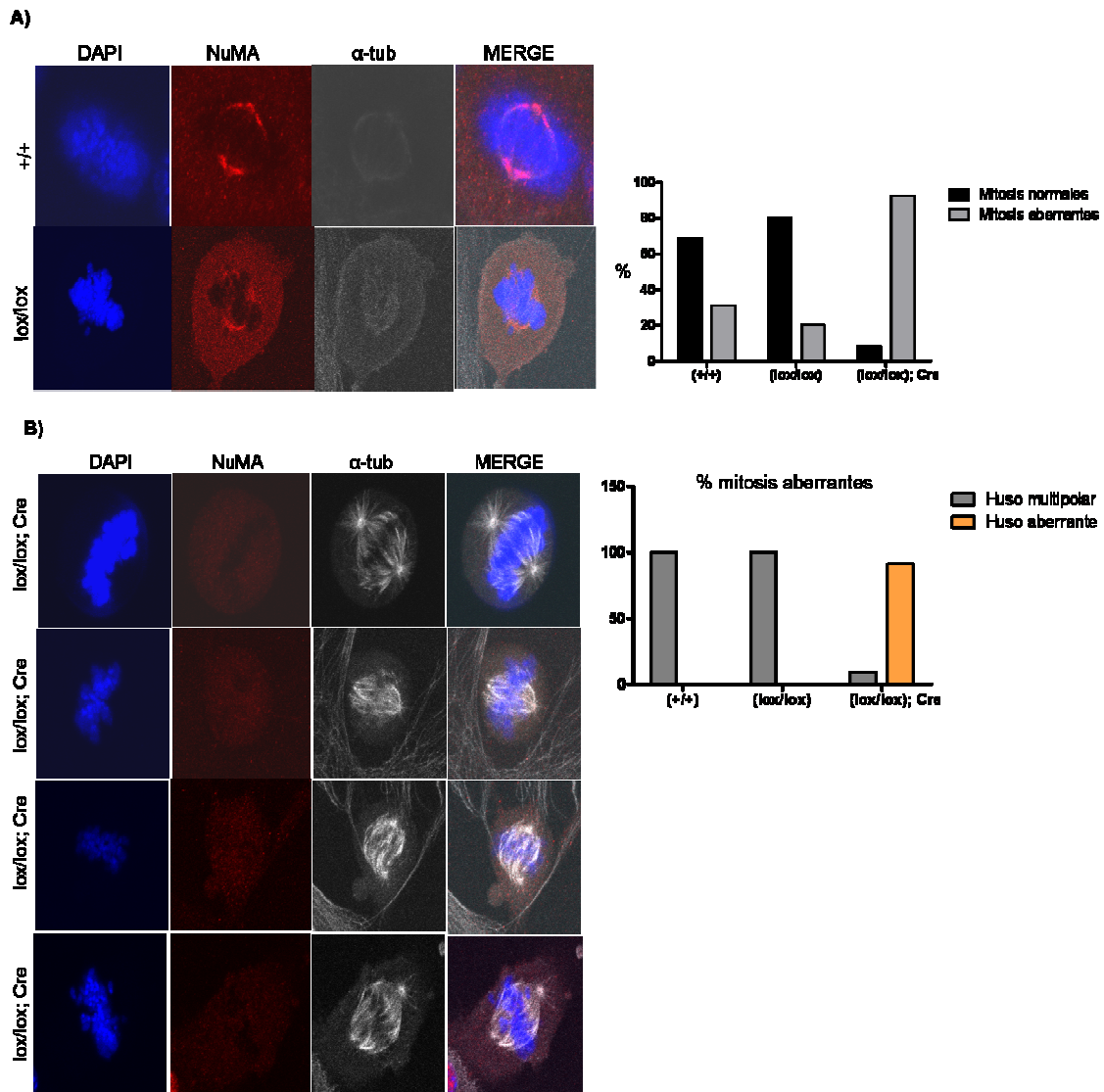


Figura 38: Defectos en el huso mitótico en fibroblastos inmortales infectados con Cre. A) Inmunofluorescencias de MEFs con genotipo wt y lox/lox para NuMA. Ejemplo de husos mutipolares en una célula $NuMA^{lox/lox}$, y de un huso normal en una célula $NuMA^{+/+}$. B) Inmunofluorescencia de MEFs de genotipo $NuMA^{lox/lox}$ y con Cre. Se muestran varios ejemplos de husos aberrantes. Tubulina en blanco, DAPI en azul y NuMA en rojo. Se contaron N=100 mitosis de fibroblastos $NuMA^{+/+}$; N=30 mitosis de fibroblastos $NuMA^{lox/lox}$ y N=12 mitosis de fibroblastos $NuMA^{lox/lox}$; Cre.

4.6. Efectos causados por la delección de NuMA en animales adultos.

Hasta ahora, la supervivencia de los ratones condicionales para el *gene trap* de NuMA es exactamente la misma que en el caso de ratones no modificados genéticamente (Figura 39) pese a la expresión disminuida de NuMA en este alelo lox.

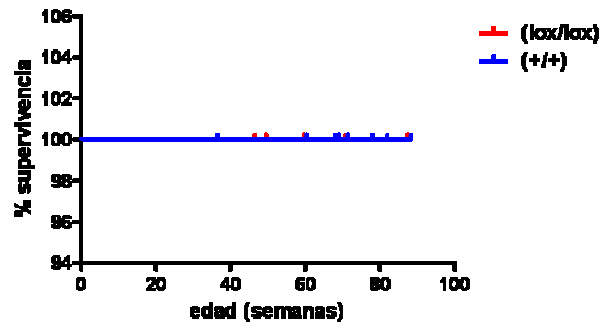


Figura 39: Curva de supervivencia de ratones condicionales para NuMA (lox/lox) y silvestres (+/+).

4.6.1. Piel

Como ya se ha comentado anteriormente, las divisiones asimétricas están asociadas frecuentemente, aunque no siempre, con divisiones celulares de orientación apical/basal. Durante los estadios más tempranos de morfogénesis de la epidermis, aproximadamente a día E12,5 de desarrollo embrionario de ratón, cuando la epidermis sólo tiene una capa, ocurren divisiones laterales. Una vez que se inicia la estratificación de la epidermis, a día 15,5 de desarrollo embrionario, se produce la rotación del plano de división celular, resultando en divisiones con orientación apical/basal. Durante los últimos estadios de desarrollo de la epidermis, a día E18,5 de desarrollo embrionario, las células intermediarias maduran a células postmitóticas de la capa espinosa, y como consecuencia, la proliferación se limita a la capa basal (Figura 40). Como las células hijas que se generan de las divisiones con orientación apical/basal adoptan distintos destinos, se propuso que las divisiones asimétricas eran esenciales para el inicio de la estratificación durante la morfogénesis de la epidermis (Lechler and Fuchs, 2005).

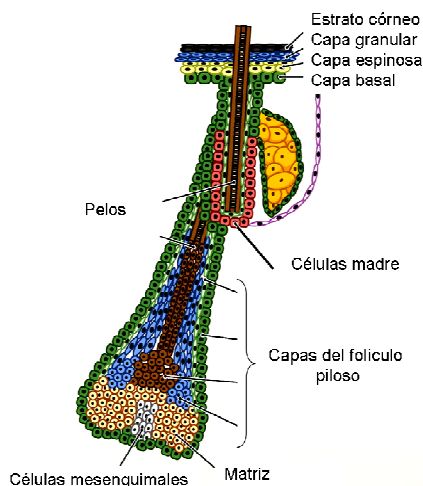


Figura 40: Esquema del folículo piloso. Las células madre residen en una región o protuberancia bajo la glándula sebácea. Al inicio de cada ciclo del pelo, las células madre se activan para formar un nuevo pelo. Mientras esto ocurre, las células de la matriz o células amplificadoras transitorias atrapan la papila dérmica en su base. Estas células progresan para diferenciarse en las capas que forman el folículo piloso (Oshima et al., 2001). Las células mesenquimales son las que forman la papila dérmica. La epidermis es un epitelio estratificado con una capa basal que contiene progenitores unipotentes y células amplificadoras transitorias. Las células basales se diferencian para formar las capas espinosa, granular y el estrato córneo. Figura adaptada de (Blanpain et al., 2007)

Se sabe que las células de la capa basal de la epidermis, usan su polaridad para dividirse asimétricamente para generar las capas superiores y renovarse. En este tipo de divisiones, al igual que en el sistema nervioso, es importante la localización de aPKC, de las proteínas Par, de LGN y también de NuMA, la cual se localiza apicalmente en las divisiones con orientación apical/basal (Lechler and Fuchs, 2005). Para analizar los efectos de la ausencia de NuMA sobre este tipo de divisiones, se cruzaron ratones condicionales para NuMA, con ratones transgénicos que expresan Cre inducible por tamoxifeno, bajo el promotor K14 (K14-CreER^{tam}) (Vasioukhin et al., 1999). El promotor humano K14 ha sido de gran utilidad para el estudio de genes mitóticamente activos de la capa basal de la epidermis del ratón, de las capas exteriores del folículo piloso, del epitelio oral y del esófago (Byrne et al., 1994; Sumpio et al., 1997; Vassar et al., 1989). Para la eliminación de NuMA en la piel de ratones adultos, este transgénico, codifica la recombinasa Cre fusionada al dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos, que reacciona a la administración de tamoxifeno, tanto oral como tópicamente. De esta manera, Cre es traslocada al núcleo de la célula y entonces puede reconocer los sitios loxP e invertir el *cassette* del *gene trap*, produciendo la eliminación de NuMA sólo en piel.

Se realizaron tratamientos con tamoxifeno, aplicado directamente en la piel de la espalda de los ratones previamente afeitados (v. Materiales y Métodos). Se hicieron cuatro grupos de ratones, por un lado de genotipos *NuMA*^{lox/lox} y *NuMA*^{+/+}, y para cada genotipo, tratados con tamoxifeno o sin tratar (añadiendo sólo etanol, el diluyente del tamoxifeno). Una semana después de finalizar del tratamiento, realizamos necropsias completas de dichos animales. Sólo en algunos casos, pudimos observar anomalías en la piel, como la presencia de papilas dérmicas y folículos pilosos aberrantes, o la presencia de grupos de células sin clasificar en la dermis (Figura 41). El hecho de

encontrar anomalías sólo en algunos animales, se debe a que el tratamiento no tuvo una eficiencia demasiado alta, ya que posteriormente, realizamos inmunohistoquímicas para detectar la presencia de NuMA y pudimos concluir que el tratamiento no había sido eficaz (datos no mostrados). Estos tratamientos se repitieron variando las condiciones de aplicación (inyección intraperitoneal, comida...) o su duración. En ninguno de los casos pudimos observar una eficiencia del 100%.

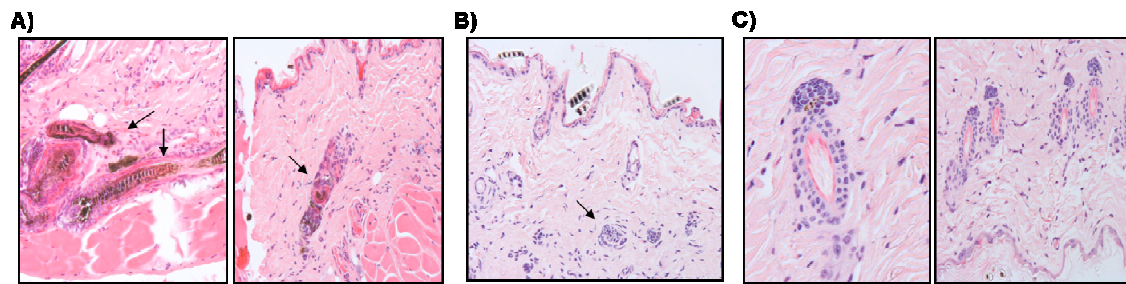


Figura 41: Cortes histológicos de piel de ratón tratado con tamoxifeno. Todas las fotografías corresponden al genotipo $NuMA^{lox/lox}$. A) Folículos pilosos aberrantes; B) Grupos de células sin identificar; C) Papilas dérmicas aberrantes. Las tinciones en todos los casos son de hematoxilina/eosina, y las flechas indican las aberraciones.

4.6.2. Sistema nervioso

Mediante el análisis patológico de necropsias realizadas a ratones condicionales ($NuMA^{lox/lox}$) a 3 meses de edad, pudimos observar algunas anomalías relacionadas con el sistema nervioso.

En primer lugar, mediante inmunohistoquímicas realizadas con los anticuerpos GFAP (marcador de astrocitos) y Ki67 (marcador de proliferación), observamos un incremento en el número de células positivas para GFAP en el caso de los animales $NuMA^{lox/lox}$. Por otro lado, cuando medimos proliferación con ki67, observamos un aumento en el número de células positivas en los animales $NuMA^{lox/lox}$, con respecto a los silvestres. Para medir proliferación en cerebro, nos centramos en la zona subventricular, donde se localizan las células progenitoras del sistema nervioso (Yoshimura et al., 2001) (Figura 42). Puede que estos animales, al ser hipomórficos, tengan algún tipo de problema en el control de la división celular de las células progenitoras, produciéndose un incremento en relación con el genotipo silvestre.

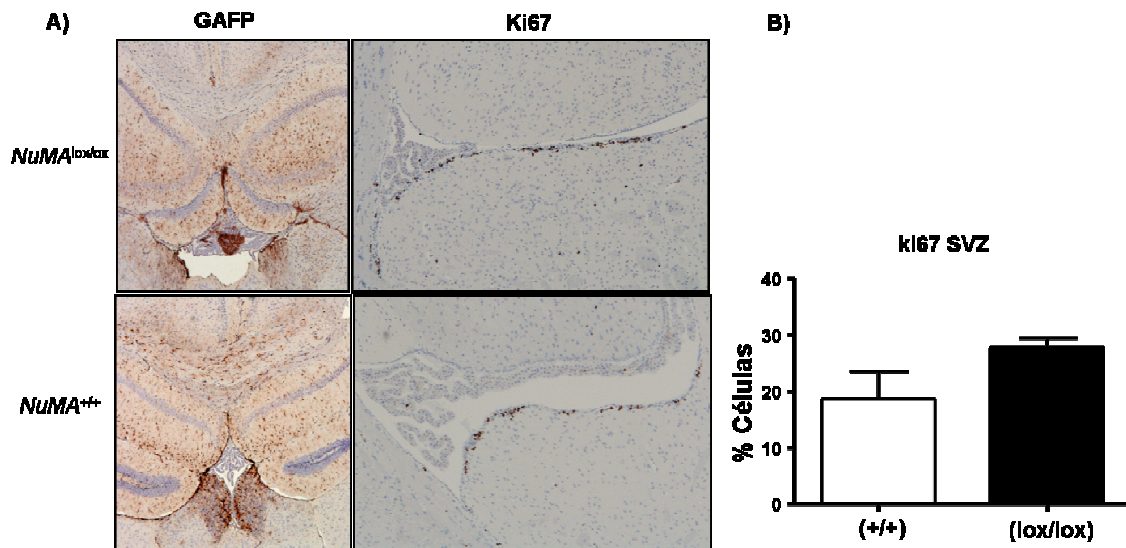


Figura 42: Inmunohistoquímicas para GFAP y Ki-67 en cerebro de ratón. Se analizaron ratones de 3 meses de edad, de genotipo *NuMA*^{lox/lox} y *NuMA*^{+/+}. A) Corte histológico e inmunohistoquímica. B) Cuantificación de las células positivas para la inmunohistoquímica de Ki-67.

Se realizaron necropsias completas de animales entre 5 y 6 meses de edad. Nos centramos en las posibles anomalías del sistema nervioso. Partiendo de lo que hemos observado anteriormente, podría ser que las células progenitoras del sistema nervioso estuvieran de alguna manera afectadas, puesto que para su renovación es necesario que se produzcan divisiones asimétricas. Para comprobar esto, se realizaron inmunohistoquímicas para Sox2 y Sox9, marcadores de células progenitoras del cerebro (Alcock et al., 2009; Pevny and Placzek, 2005) (Figura 43). El resultado nos indica que existe un ligero incremento en el número de células progenitoras del sistema nervioso en los animales *NuMA*^{lox/lox}.

Aunque estos resultados son muy preliminares, nos dan una pista sobre el efecto que puede tener una disminución de NuMA sobre el sistema nervioso de ratón. Puede ser que las divisiones asimétricas no se estén produciendo de manera correcta, y que por lo tanto, existe una pequeña variación en nuestros animales hipomórficos que está afectando al número de células progenitoras y diferenciadas.

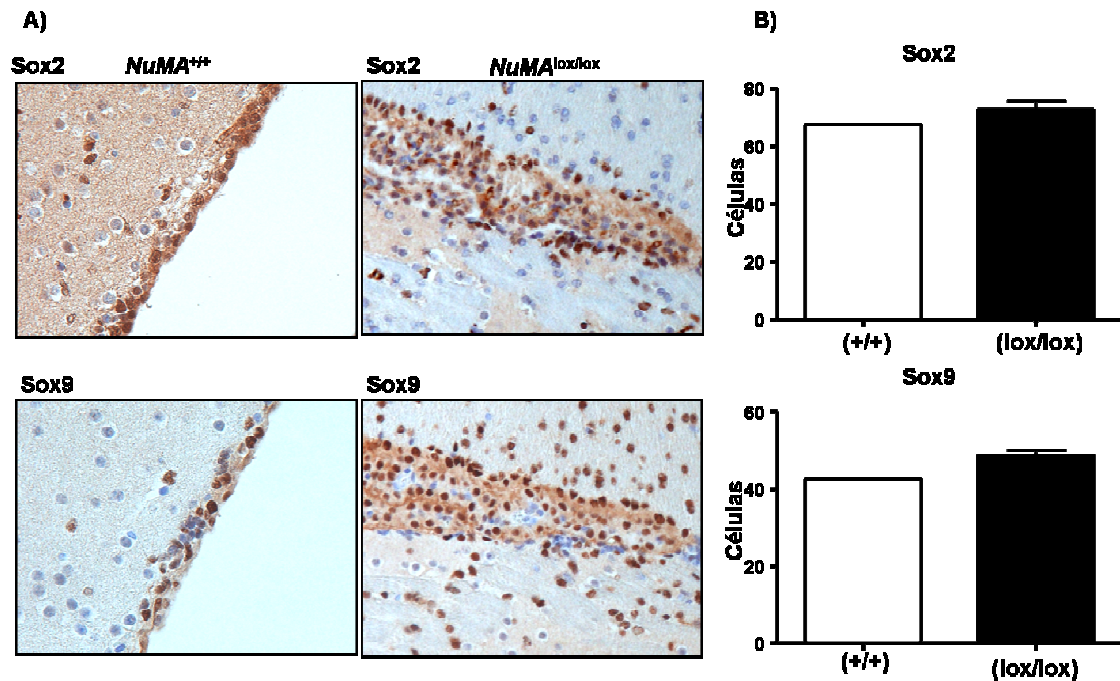


Figura 43: Inmunohistoquímica para Sox 2 y Sox 9 en cerebro de ratón. Se analizaron ratones de 6 meses de edad, de genotipo $NuMA^{lox/lox}$ y $NuMA^{+/+}$. A) Corte histológico e inmunohistoquímica. B) Cuantificación de las células positivas para las inmunohistoquímicas de Sox2 y Sox9 (sobre un total de 1000 células).

Por último, y puesto que a nivel embrionario también existe una pequeña disminución en el número de embriones $NuMA^{lox/lox}$ (Figura 30), realizamos un estudio patológico de embriones de día 16.5 y 17.5, con genotipos $NuMA^{lox/lox}$ y $NuMA^{+/+}$. En este caso, en la médula ósea se observó una ligera disminución en el número de motoneuronas y una desorganización en su localización (Figura 44). Normalmente, las motoneuronas se sitúan en la parte ventral de la médula ósea de manera ordenada y homogénea. Se trata de células grandes que proyectan sus axones fuera del sistema nervioso central para el control directo o indirecto de los músculos (Wolpaw and Tennissen, 2001)

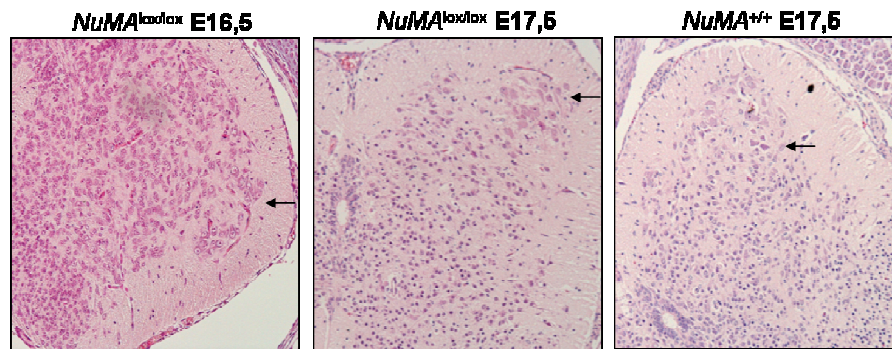


Figura 44: Cortes de médula ósea de embriones de ratón. Tinción con hematoxilina/eosina. Los embriones son de día 16,5 y 17,5 de desarrollo embrionario. Las flechas señalan las motoneuronas

Todos estos resultados histológicos que nos demuestran que el sistema nervioso de los ratones con una pequeña deficiencia para NuMA presenta ciertas anomalías, nos llevó a realizar ensayos de aprendizaje con animales de varias edades y sexos, de genotipos *NuMA^{lox/lox}*, *NuMA^{+/lox}* y *NuMA^{+/+}*, con el objeto de encontrar una relación entre las anomalías a nivel histológico y el comportamiento de estos ratones frente a distintos objetos.

Se ha descrito que los ratones pasan más tiempo explorando nuevos objetos que objetos con los que ya están familiarizados o que ya han reconocido anteriormente. El ensayo de reconocimiento de objetos que se hizo, para estudiar la capacidad de memoria de reconocimiento de estos animales, se realizó siguiendo un protocolo basado en dos fases. En la primera, se le presenta al animal un objeto, para que se familiarice con él, pero en un ambiente distinto al habitual. Posteriormente, el animal vuelve a su caja habitual y en una segunda fase al animal se le presentan dos objetos: el que previamente ya había reconocido, y uno nuevo. Teóricamente, el animal debe pasar más tiempo explorando el objeto nuevo (Bevins and Besheer, 2006; Ennaceur and Delacour, 1988) (Figura 45)

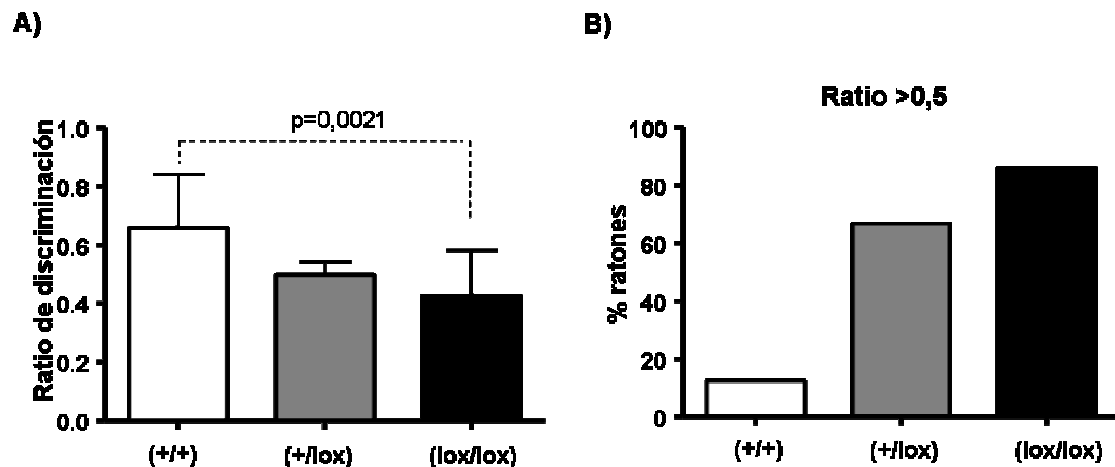


Figura 45: Ensayo de estudio de aprendizaje. Arriba: esquema del ensayo. A-B) Resultados del ensayo de estudio de comportamiento. A) El ratio de discriminación se obtuvo dividiendo el tiempo que pasa cada ratón reconociendo el objeto nuevo, entre el total de tiempo que pasa reconociendo ambos objetos, el nuevo y con el que ya estaba familiarizado. B) Se muestra el porcentaje de ratones en los cuales el ratio de discriminación es mayor de 0,5, es decir, que pasan menos tiempo en el reconocimiento del objeto nuevo. Para este ensayo, se emplearon 8 ratones wt, 3 ratones +/- y 14 ratones lox/lox.

Durante el ensayo, después de la familiarización con la caja y los objetos, se midieron los tiempos, para cada animal por separado, que pasaban con el objeto viejo (familiarizado) y con el nuevo. Con estos datos se obtuvo el ratio de discriminación, que se calculó dividiendo el tiempo que pasaba con el objeto nuevo entre el tiempo total que pasaba con ambos objetos. Esto quiere decir que si pasa más tiempo con el objeto nuevo, el valor será menor de 0,5. Los resultados obtenidos muestran una clara diferencia entre los ratones *NuMA*^{lox/lox} analizados con respecto a los controles (*NuMA*^{+/+}) (Figura 45 A-B). Los primeros pasaron, en general, el mismo o menos

tiempo con el objeto nuevo. Esto demuestra que existe un problema de memoria de reconocimiento en los animales hipomórficos para NuMA.

Con estos resultados, y con el objeto de profundizar más en el función de NuMA en el desarrollo del sistema nervioso de ratón, se cruzaron animales condicionales para NuMA, con animales transgénicos Nestin-Cre, los cuales son capaces de expresar la recombinasa Cre, pero bajo el promotor de la nestina (Dubois et al., 2006). La Nestina es una proteína intermediaria filamentosa, que se identificó como precursor de las células neuroepiteliales de rata (Lendahl et al., 1990). Se sabe que el promotor de nestina, se expresa sobre todo en el sistema nervioso central, con lo cual si se cruzan los animales condicionales para NuMA con Nestin-Cre, obtendremos una delección de NuMA, sólo en los tejidos del sistema nervioso central.

Estos cruces se están llevando a cabo en estos momentos, por lo que será necesario esperar un tiempo hasta que se pueda estudiar el fenotipo resultante, que nos permitirá llegar a una conclusión clara en cuanto al papel de NuMA en el sistema nervioso de mamíferos.

5. DISCUSIÓN

El papel de la regulación del ciclo celular en el desarrollo del cáncer ha sido muy estudiado durante estos últimos años. Las células tumorales acumulan mutaciones que resultan en señales mitogénicas esenciales y respuestas defectuosas a señales anti-mitogénicas, lo cual contribuye a una proliferación descontrolada (Malumbres and Barbacid, 2001; Massague, 2004). Además, muchos tumores adquieren inestabilidad genómica, que da lugar a mutaciones adicionales, y también inestabilidad cromosómica, defecto responsable de los cambios numéricos de los cromosomas (Kastan and Bartek, 2004; Suijkerbuijk and Kops, 2008). Estas alteraciones pueden resultar no sólo en ventajas proliferativas, sino también en un incremento en la susceptibilidad a la acumulación de alteraciones genéticas adicionales que contribuyen a la progresión tumoral y la adquisición de fenotipos más agresivos.

5.1. Cdk, inhibidores INK4 y el control de G1/S

Las alteraciones encontradas en tumores humanos afectan frecuentemente a la ruta de retinoblastoma y sus reguladores, siendo frecuente la sobreexpresión de ciclinas o inactivación de CKIs ($p16^{\text{INK4a}}$ y $p15^{\text{INK4b}}$) y, en definitiva, a la activación desmedida de las quinasas Cdk4 y Cdk6. Las alteraciones genéticas o epigenéticas en Cdk2 o sus reguladores han sido raramente descritas en tumores humanos aunque es frecuente encontrar sobreexpresión de ciclina E1 y/o niveles reducidos de $p27^{\text{Kip1}}$, en muchos casos con valor pronóstico en el desarrollo de la enfermedad (Lloyd et al., 1999; Philipp-Staheli et al., 2001; Porter et al., 1997).

Al contrario que en el caso de Cdk2, la desregulación de Cdk4 y Cdk6 en el desarrollo de tumores sí tiene una clara base genética y viene determinada en muchos casos por alteraciones cromosómicas (como amplificación de ciclina D1 o Cdk4, translocación de Cdk6 o delección de los genes supresores como $p16^{\text{INK4a}}$) o inactivaciones epigenéticas (metilación de los promotores de $p16^{\text{INK4a}}$ y $p15^{\text{INK4b}}$). También se han identificado, aunque con baja frecuencia, mutaciones puntuales en Cdk4 y Cdk6 que dan lugar a la pérdida de su capacidad de unirse a los inhibidores INK4 (Easton et al., 1998; Steitz et al., 2006). Un buen ejemplo de este caso lo constituye la mutación R24C en Cdk4, encontrada en pacientes de melanoma con origen somático o hereditario (Steitz et al., 2006; Zuo et al., 1996). Según se deduce de su efecto molecular, esta mutación debería ser equivalente a la inactivación simultánea de los cuatro inhibidores de la familia INK4 ($p16^{\text{INK4a}}$, $p15^{\text{INK4b}}$, $p18^{\text{INK4c}}$ y $p19^{\text{INK4d}}$), aunque su incidencia en la enfermedad humana es muy limitada (Steitz et al., 2006). Esta discrepancia puede deberse al hecho de que las mutaciones puntuales en el *locus* Cdk4 humano pueden ser más infrecuentes que la delección o inactivación

de sus inhibidores. Asimismo, conviene recordar el hecho de que esta mutación en Cdk4 puede dejar libres los inhibidores INK4 que podrían tener un efecto inhibitorio mayor sobre la actividad Cdk6.

Debido a la frecuencia de desregulación de Cdk6 y Cdk4 en tumores humanos, destacando las amplificaciones o sobreexpresiones de Cdk6 en diversos tipos de linfomas (Chilosi et al., 1998; Santamaria et al., 2008), y a la posibilidad de desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a la inhibición de Cdk6 y Cdk4, el estudio biológico de la función de estas quinasas resultan de interés básico y aplicado. Por ello, y para comprender el efecto único o combinado de la ausencia de inhibición de Cdk4 y Cdk6 por los inhibidores INK4, se ha generado un modelo *knock in* de Cdk6, que porta la mutación R31C, homóloga a R24C de Cdk4.

Cdk6 es regulador de la ruta de la proteína retinoblastoma (pRb) y es crucial en el desarrollo de las células T (Hu et al., 2009). La actividad de Cdk6 está controlada por su asociación con las ciclinas D y por los inhibidores de las Cdk, incluyendo los miembros de las familias INK4 y CIP/KIP. De los tres tipos de ciclinas D, los timocitos expresan sobre todo las ciclinas D2 y D3. Ciclina D3 se induce fuertemente en los estadios DN4 y simples positivos inmaduros, después del pre-ensamblaje de los receptores de células T. Por otro lado, la expresión de ciclina D2 es elevada en los estadios DN1-DN3, antes del pre-esamblaje de los receptores de las células T. Por lo tanto, Cdk6 juega un papel importante como proteína que se asocia con ciclina D en las distintas fases de desarrollo de los timocitos. Se sabe que los *knock out* para Cdk2 y Cdk4 no tienen ningún efecto en el desarrollo de las células T (Ortega et al., 2003; Rane et al., 1999), aunque se ha observado un considerable descenso en la celularidad de los timos en los animales *knock out* para Cdk6 (Malumbres et al., 2004), de acuerdo con una expresión predominante de Cdk6 en los distintos tipos de células hematopoyéticas (Chilosi et al., 1998; Della Ragione et al., 1997).

En los ratones *Cdk6*^{R31C/R31C} encontramos un aumento en el número de células en el estadio DN4. Estos resultados concuerdan con los observados en el *knock out* de ciclina D3 (Sicinska et al., 2003). Las poblaciones dobles negativas se dividen en cuatro estadios de desarrollo (DN1-4). Hasta DN3, la proliferación de los timocitos se lleva a cabo gracias a las interleuquinas y a cKit (Di Santo et al., 2000). En el estadio DN3, se produce la reordenación de las cadenas β de los receptores de las células T y el pre-ensamblaje de otros receptores. En este punto, ciclina D3 es necesaria para la proliferación de los timocitos, ya que los ratones deficientes para esta ciclina presentan problemas en la expansión de los timocitos inmaduros a partir del estadio DN3. Según nuestros resultados, la transición de DN3 a DN4 está claramente favorecida por la insensibilidad de Cdk6 a los inhibidores INK4.

En general, observamos en nuestros ratones *Cdk6*^{R31C/R31C} un incremento en el número de progenitores hematopoyéticos. En estudios recientes, se ha demostrado que Cdk6 tiene un papel importante en el bloqueo de la diferenciación. Por ejemplo, la expresión de Cdk6 en los astrocitos de ratón da lugar a un cambio drástico de morfología, que está relacionado con cambios en la expresión de marcadores de diferenciación (Ericson et al., 2003). Células MEL (*murine erythroid leukemia*) que expresan la forma resistente a los inhibidores INK4 de Cdk6 (mutación R31C), pero no la de Cdk4 (R24C), no son capaces de diferenciarse (Choe et al., 2003). La sobreexpresión de Cdk6 también inhibe la diferenciación de los osteoblastos estimulados, y los niveles de proteína de Cdk6, pero no de Cdk4 disminuyen en la diferenciación de osteoclastos de células monocíticas de ratón (RAW) (Ogasawara et al., 2004).

La coordinación entre diferenciación y arresto en el ciclo celular relaciona la actividad de los reguladores transcripcionales, que activan la expresión de genes específicos de cada línea celular, y la maquinaria del ciclo celular. Como se ha demostrado con los ejemplos anteriores, la importancia de esta coordinación es fundamental para una correcta diferenciación de los numerosos tipos celulares. En nuestro caso, como ya se ha visto, Cdk6 se expresa en los progenitores del sistema hematopoyético y la mutación de Cdk6, R31C, provoca una desregulación del ciclo celular de dichos progenitores, y por lo tanto se produce una falta de diferenciación de los mismos y su acumulación. Por ejemplo, se ha demostrado que Cdk6, pero no Cdk4, es capaz de inhibir factores de transcripción como Runx1, importante para la diferenciación de múltiples tipos celulares, incluidas las células hematopoyéticas. La interacción entre Cdk6-Runx1, combinada con una disminución de Cdk6 en la diferenciación de los granulocitos, demuestra que Cdk6 es capaz de bloquear la asociación de factores de transcripción con promotores específicos de diferenciación (Fujimoto et al., 2007).

Las patologías principales de los ratones adultos son los linfomas, en un elevado porcentaje. Esto, junto con el incremento acusado de proliferación de los timocitos de ratones *Cdk6*^{R31C/R31C}, y la acumulación de células inmaduras en ratones de más de 80 semanas (DN), frente a la disminución de DP, nos demuestra que Cdk6 tiene un papel importante en la diferenciación de los linfocitos. La falta de inhibición por las proteínas de la familia INK4 mantiene a Cdk6 activo y se produce un incremento de la proliferación de las células hematopoyéticas linfoides. De esta manera, el proceso de diferenciación de las mismas está dañado.

El resultado del análisis de sangre periférica de ratones jóvenes *Cdk6*^{R31C/R31C}, no muestra diferencias significativas con sus hermanos *Cdk6*^{+/+}, aunque el resultado en ratones adultos nos muestra una clara acumulación de linfocitos en *Cdk6*^{R31C/R31C}.

Si observamos el número relativo de progenitores inmaduros linfoides, vemos que han disminuído considerablemente en estos ratones adultos. Estos resultados nos confirman que existe un incremento en la proliferación y una disminución en la diferenciación, cuyas consecuencias se hacen más acusadas a medida que los ratones envejecen. Se sabe que la reducción de la capacidad proliferativa celular, en general está relacionada con la edad. Este fenómeno se percibe claramente en los linfocitos T (Hori et al. 1973; Foad et al. 1974; Hung et al. 1975; Walters and Claman 1975; Joncourt et al. 1981; Schwab et al. 1985), y constituye en mecanismo básico por el cual la respuesta inmunitaria en ancianos se encuentra dañada.

Los cultivos primarios de linfocitos T derivados de organismos maduros muestran que el principal problema en la progresión en el ciclo celular ocurre antes de la fase S (Tice et al. 1979; Kubbies et al. 1985). La progresión de los linfocitos T a través de G1 se lleva a cabo principalmente por Cdk6. Se observa una gran disminución de su actividad asociada con la edad, no relacionada con una disminución de su expresión, que, según nuestros resultados, podría deberse a una inhibición por las proteínas de la familia INK4.

Mediante el estudio de ratones deficientes para $p18^{\text{INK4c}}$, se llegó a la conclusión de que este miembro de la familia INK4 regula las decisiones de los destinos celulares de las células madre hematopoyéticas, ya que afecta el balance entre diferenciación y auto-renovación (Yuan et al. 2004). Otros estudios sugieren que existe un papel importante para $p16^{\text{INK4a}}$ en la auto-renovación de las células madres hematopoyéticas en condiciones de estrés oxidativo (Ito et al. 2004). La función de las proteínas INK4 en hematopoyesis no está tan clara en los estadíos más tardíos de la hematopoyesis. Recientemente se ha descrito el papel de $p15^{\text{INK4b}}$ en hematopoyesis con el uso de ratones deficientes en esa proteína. Mediante citometría de flujo, se ha visto que presentan un incremento considerable en el número de progenitores de granulocitos y macrófagos, así como un aumento en el potencial proliferativo de estos progenitores. En el análisis de nuestros ratones $Cdk6^{\text{R31C/R31C}}$ también observamos un incremento acusado en los progenitores de granulocitos y macrófagos, tanto en animales jóvenes como en viejos. Por lo tanto, podemos concluir que el efecto de la ausencia de inhibición en Cdk6 por las proteínas de la familia INK4 causa defectos de diferenciación de varias poblaciones hematopoyéticas, siendo las más destacadas las de la línea linfoide.

Los ratones mutantes dobles $Cdk4^{\text{R24C/R24C}}$; $Cdk6^{\text{R31C/R31C}}$ presentan una letalidad embrionaria tardía, alrededor de día 16,5-17,5 de desarrollo embrionario. El tamaño y el aspecto general de los embriones, no difiere demasiado del de embriones silvestres de la misma edad, pero en el caso de los dobles mutantes, se observan anomalías en la organización del hígado fetal. El hígado en uno de los órganos del

cuerpo más grandes y lleva a cabo un elevado número de funciones complejas esenciales para la vida. Estas funciones van desde la conversión de glucosa en glucógeno, producir ácidos biliares, hasta formar proteínas plasmáticas y filtrar sustancias nocivas para la sangre.

En el ratón, el desarrollo del hígado comienza alrededor del día 9 de desarrollo embrionario. Durante el periodo de desarrollo de día 10,5 a 12,5, el hígado se convierte en el sitio más importante de hematopoyesis (Hata et al, 2007). Alrededor del día 14,5, los hepatocitos y las células de los conductos biliares se empiezan a desarrollar a partir de los hepatoblastos. Como estos hepatoblastos se transforman de manera gradual en hepatocitos maduros, la principal función del hígado pasa de hematopoyesis a metabolismo (Hata et al, 2007; McLin et al 2006).

Hemos analizado las distintas poblaciones hematopoyéticas en hígado fetal de embriones de día 13,5 y no se observan diferencias en las células madre hematopoyéticas, aunque se observa un acusado incremento en el número de progenitores de la línea linfóide. Como ya se ha mencionado, en los ratones jóvenes y adultos $Cdk6^{R31C/R31C}$, el número de progenitores linfoides está disminuido en relación con sus hermanos silvestres. Parece que la completa ausencia de inhibición por las proteínas INK4 provoca un incremento en la proliferación de algunos tipos celulares, en nuestro caso, para el genotipo $Cdk4^{R24C/R24C}$; $Cdk6^{R31C/R31C}$, de aquellas presentes en el embrión como los progenitores hematopoyéticos linfoides y que esto, extrapolándolo a ratones adultos mutantes para Cdk6 (R31C), se refleja en un descenso de las células progenitoras y un incremento de las células maduras, lo que da lugar a las hiperplasias observadas en timo y posteriormente con el envejecimiento de los ratones a linfomas.

Los análisis histológicos de los embriones de día 16,5 de desarrollo embrionario también nos indican aberraciones morfológicas de los eritrocitos maduros existentes en los vasos sanguíneos, tanto del hígado fetal como del resto del embrión. Esta característica de los eritrocitos es típica en los casos de anemia causada por alteraciones en las divisiones de los precursores eritroides. Además, el número de estos precursores está incrementado de forma significativa en los embriones dobles mutantes. Esto sugiere que una de las causas de la letalidad embrionaria en estadios tardíos del desarrollo podría ser un problema en la diferenciación de los progenitores eritroides. Cdk4 y Cdk6 se expresan de manera diferencial en los distintos estadios de la maduración eritroide (Matushansky, 2000). Cuando los precursores eritroides están transformados, como en células de ratón con eritro-leucemia (MEL), existe un bloqueo en el estadio de pro-eritroblasto y su diferenciación requiere la inhibición de Cdk6, pero no de Cdk4 (Matushansky, 2000). Por consiguiente, la diferenciación terminal dependiente de eritropoyetina de los eritroblastos primarios se correlaciona con una

disminución temprana de la actividad de Cdk6, seguida por una disminución tardía de la actividad de Cdk4 (revisado en Steinman, 2002).

Nuestras observaciones de que la falta de inhibición de Cdk4 y Cdk6 afecta gravemente al sistema hematopoyético están de acuerdo con esos estudios aunque demuestran que Cdk4 y Cdk6 pueden complementarse, al menos parcialmente, *in vivo*. Además, el doble *knock out* para Cdk4 y Cdk6 también presenta problemas hematopoyéticos y los ratones no llegan a ser viables, produciéndose una letalidad embrionaria tardía, causada principalmente por un problema de maduración de las distintas líneas hematopoyéticas y por una disminución en el número de células sanguíneas en sangre periférica. Esto lleva a una anemia severa, responsable de la muerte de los embriones (Malumbres, Sotillo et al. 2004). En nuestro caso ocurre lo contrario, existe un aumento de progenitores, principalmente linfoides y eritroides, y un problema en la diferenciación de los mismos, produciéndose una situación parecida de anemia, y por lo tanto provocando la muerte del embrión. Este argumento no puede extrapolarse a todos los tipos celulares, ya que *in vitro*, los MEFs proliferan bien y el resto de los tejidos de los embriones *Cdk4*^{R24C/R24C}; *Cdk6*^{R31C/R31C} no presentan anomalías.

Por lo tanto, Cdk4 y Cdk6 actúan en distintos estadios de diferenciación eritroide. Los niveles de Cdk6 están regulados por PU.1, un factor de transcripción hematopoyético, necesario para el desarrollo de monocitos, granulocitos y linfocitos B, aunque no para la diferenciación de los eritrocitos. Su expresión desregulada en precursores eritroides, causada por la inserción proviral en el locus que codifica PU.1, es clave para el desarrollo de la eritroleucemia inducida por el virus Friend (Moreau-Gachelin et al. 1988; Paul et al 1989). La unión de PU.1 a Gata-1, el factor de transcripción específico eritroide, da lugar a la represión de Gata-1 (Gusella et al., 1976; Hsieh et al., 2000; Kiyokawa et al., 1994) y al bloqueo de la diferenciación eritroide de las células MEL (Choe et al., 2003). Es necesaria una disminución de Cdk6 y de PU.1 para que estas células MEL reinicien su diferenciación. Estas observaciones apoyan nuestros resultados observados en los embriones *Cdk4*^{R24C/R24C}; *Cdk6*^{R31C/R31C}, ya que la no inhibición de estas quinasas por los inhibidores INK4, impide la diferenciación de los precursores eritroides, como hemos observado en nuestros embriones.

Finalmente, y como ya hemos comentado, Cdk6 es regulador de la proteína retinoblastoma. Los ratones *knock out* para Rb son letales embrionarios a día 14,5 de desarrollo embrionario, presentando defectos hematopoyéticos, entre otros como la neurogénesis (Clarke et al 1992; Jacks et al 1992; Lee et al 1992).

En general, estos resultados muestran que la desregulación de la ruta INK4/Cdk4-6/pRb está involucrada en el control de la proliferación celular en el sistema hematopoyético, como se ha demostrado en estudios con otros modelos

animales, como los *ko* de las proteínas inhibidoras INK4, pRb, ciclina D, Cdk4 y Cdk6. Estos resultados validan la importancia de las kinasas que regulan el ciclo celular, y más concretamente la progresión a través de G1 y la transición G1/S en la diferenciación y desarrollo de células especializadas como las del sistema hematopoyético. La diana ideal para la intervención farmacológica tendría que ser esencial para el crecimiento o la supervivencia de las células tumorales, pero no necesaria para la viabilidad de las células normales. Cdk6 y Cdk4 cumplen estos requerimientos ya que no son esenciales para el desarrollo del ratón ni para la proliferación de células normales en cultivo como hemos mostrado. Sin embargo, la pérdida de uno de sus múltiples mecanismos de regulación —inhibición por proteínas INK4— es suficiente para desarrollar graves alteraciones en el sistema hematopoyético principalmente.

5.2. Control del huso mitótico por NuMA y su relevancia *in vivo*.

Los mecanismos por los cuales los cromosomas se separan de manera equitativa en dos células hijas se llevan analizando desde que Theodor Boveri describió el efecto de una segregación cromosómica desigual en las células hijas, postulando que podría ser la causa del desarrollo de tumores y defectos en el nacimiento, teniendo en cuenta las observaciones previas de von Hansemann de figuras mitóticas anormales en algunas muestras de carcinomas (von Hansemann, D. 1890, Boveri T, 1902). Es posible que todas las aneuploidías humanas (células con un contenido distinto a 46 cromosomas) que ocurren durante el desarrollo dan lugar a letalidad embrionaria (excepto algunos casos de ciertas combinaciones de cromosomas sexuales y trisomías de los cromosomas 13, 18 y 21, que dan lugar a defectos importantes en el nacimiento). Además, muchas células de tumores sólidos son aneuploides y muchas células de líneas tumorales presentan inestabilidad cromosómica (Lengauer et al., 1997). Las causas de este desequilibrio cromosomal son desconocidas, pero probablemente se encontrarán posibles defectos en los procesos que controlan el huso mitótico y la segregación de los cromosomas durante mitosis.

El huso mitótico está compuesto por una colección de microtúbulos bipolares, necesarios para el alineamiento y la segregación de los cromosomas durante mitosis. Los polos del huso son focos para los polos negativos de los microtúbulos del huso y sirven de destino final para los cromosomas que se han segregado en anafase (Compton, 1998). En las mitosis de las células somáticas animales, los polos del huso coinciden con los centrosomas, el centro organizador de microtúbulos más importante, aunque se puede prescindir de ellos para la formación del huso o de los polos (Heald et al., 1996; Khodjakov et al., 2000; Mahoney et al., 2006). En estudios previos en los

que usaban extractos de *Xenopus in vitro*, se estableció un papel para una proteína muy abundante en los polos del huso, NuMA (*nuclear mitotic apparatus*), que consistía en la formación de los polos del huso, de manera independiente de los centrosomas (Heald et al., 1996; Merdes et al., 2000). Sin embargo, la contribución que ejercen NuMA y los centrosomas en el establecimiento y mantenimiento de la integridad de los polos del huso está pendiente de resolverse. Estudios previos indican que NuMA tiene un papel en la captación de las fibras de los cinetocoros en los polos (Khodjakov et al., 2003). NuMA es transportada hacia los polos del huso gracias a la dineína (Merdes et al., 2000). En este trabajo hemos demostrado que la ausencia de NuMA provoca, entre otros problemas, defectos en la formación del huso, debido a que los microtúbulos no son capaces de formar polos definidos. Esto sugiere que NuMA es necesaria para el transporte de las fibras de extremos negativos de los cinetocoros a los polos del huso bipolar. Este hecho proporciona una evidencia clara de que la función de NuMA durante la mitosis se basa en el mantenimiento de las conexiones del huso, pero no de su establecimiento, ya que en ausencia de NuMA, el inicio de la formación del huso mitótico ocurre de manera normal pero es al final de metafase cuando se producen alteraciones en la focalización de los microtúbulos del huso (Silk et al., 2009).

La formación del huso bipolar en ausencia de NuMA sugiere que existe un proceso alternativo relacionado con el establecimiento de los polos del huso, y puede que este proceso sea dependiente de los centrosomas, que puede que cooperen con componentes como HSET en mamíferos y Ncd en *Drosophila* (Gordon et al., 2001; Goshima et al., 2008).

La eliminación de la función de la dineína, da lugar a una serie de defectos parecidos a los que hemos observado en ausencia de NuMA (Goshima et al., 2008; Heald et al., 1997). La inhibición de la dineína provoca una redistribución de NuMA desde los polos del huso hacia toda la extensión de los microtúbulos. Esto sugiere que una de las principales funciones de la localización de la dineína en el huso en mitosis podría ser el transporte de NuMA hacia los polos negativos de los microtúbulos (Gaglio et al., 1997; Merdes et al., 2000).

Los defectos observados en el huso de los fibroblastos en ausencia de NuMA, provocan un pequeño retraso en la progresión de mitosis, pero este defecto no es lo suficientemente agresivo como para producir una parada en mitosis. Un solo cinetocoro no unido a los microtúbulos, es capaz de retrasar el inicio de anafase (Rieder and Salmon, 1994). Esto indica que la captación de los microtúbulos por los cinetocoros ocurre de manera eficiente en ausencia de NuMA. Además, la mayor parte de la segregación cromosómica ocurre de manera normal en los husos que no están unidos a los centrosomas y con polos desenfocados. Estas observaciones muestran

que el hecho de que los polos estén correctamente posicionados, no es un requerimiento absoluto para que todos los cinetocoros estén unidos a los microtúbulos del huso y para que la mayoría de los cromosomas se alineen y segreguen en anafase. Además, en plantas, las células llevan a cabo mitosis con éxito sin centrosomas, usando husos mitóticos en los que los polos no están bien definidos (Yuan et al., 2004). Se ha visto que las fuerzas mecánicas de las fibras de los cinetocoros entre los polos del huso y los cinetocoros, no son capaces de prevenir los movimientos de los cromosomas en contra de los polos (Nicklas, 1997).

Aunque parece que la segregación de la mayoría de los cromosomas ocurre de manera normal, en algunas células se han visto defectos en el alineamiento de los cromosomas. Estos defectos pueden dar lugar a errores en la segregación cromosómica que podrían explicar el requerimiento de NuMA en la correcta localización de los polos para la viabilidad del ratón durante el desarrollo embrionario, y para una proliferación celular correcta. Esto concuerda con la letalidad embrionaria que da lugar a una incorrecta segregación de los cromosomas, como ocurre en ausencia de CENP-E (*centromeric protein E*) (Putkey et al., 2002)

La letalidad embrionaria en ausencia de NuMA, ocurre de manera temprana, a día 6,5 de desarrollo embrionario y podría tener varias explicaciones. Por un lado, el fallo en la segregación de los centrosomas como elemento carga del huso (Pickett-Heaps, J. 1969), que no son necesarios para el funcionamiento del huso mitótico, pero son esenciales para un desarrollo embrionario normal (Chatzimeletiou et al., 2008). Esta explicación demostraría que NuMA y su papel en la correcta localización de los microtúbulos de los polos del huso es un componente necesario para que la progresión mitótica se realice de manera normal y para el desarrollo embrionario. Por otro lado, la letalidad embrionaria en ausencia de NuMA, se produce una vez que el embrión se ha implantado en la pared uterina, que tiene lugar a día 4,5 de desarrollo embrionario. En este momento es cuando la masa de células internas se divide en dos capas, una llamada hipoblasto, que se encuentra próximo al blastocelo y da lugar al endodermo primitivo (y posteriormente a la capa más externa del saco vitelino), y la otra capa es el epiblasto, que dará lugar a todas las células del embrión, y que por lo tanto se considera que está formado por células pluripotentes e indiferenciadas (Gilbert and Merlet-Benichou, 2000; Hogan et al., 1994) (Figura 29). Posteriormente, a día 6 de desarrollo embrionario, existen tres capas diferenciadas: el trofoblasto, el epiblasto y el endodermo primitivo. Durante la fase de gastrulación, el epiblasto embrionario se diferenciará en las tres capas germinales primarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. En este punto, en el que las células del epiblasto comienzan a diferenciarse, es cuando se produce la letalidad del embrión en ausencia de NuMA. Concretamente, las células pluripotentes del epiblasto tienen que diferenciarse para

dar lugar a todos los tejidos que formarán parte del embrión. Se sabe que las células madre pueden dividirse para dar lugar a más células madre, pero también se dividen para dar lugar a células distintas que se diferenciarán específicamente según el caso. Para esto, pueden llevar a cabo divisiones asimétricas, mediante las cuales, las proteínas que determinan el destino de la célula se distribuyen asimétricamente, es decir, sólo en una de las dos células hijas. Por otro lado, también pueden orientar el plano de división de manera que sólo una de las células hijas mantenga el contacto con las células madre. Estas rutas han sido estudiadas principalmente en *Drosophila*, pero las moléculas que intervienen en estos procesos están muy conservadas en vertebrados, aunque el modo en el que actúan es específico de tejido y a veces muy diferente de los invertebrados.

Los modelos animales de NuMA que hemos desarrollado pueden ayudarnos a entender las funciones esenciales de NuMA en las divisiones embrionarias y quizás también su papel durante las divisiones asimétricas. En trabajos anteriores se habían determinado las proteínas asociadas con las divisiones asimétricas que tienen lugar durante el desarrollo de la epidermis (Lechler and Fuchs, 2005) y se sugirió que NuMA tenía un papel importante durante la orientación del huso mitótico para que tengan lugar dichas divisiones. En animales adultos no hay estudios que indiquen que el mecanismo de renovación de la epidermis a partir de las células basales sea exactamente el mismo. Según nuestras observaciones, las anomalías en el desarrollo de la piel de ratones condicionales tratados con tamoxifeno, y por lo tanto provocando la eliminación de la expresión de NuMA en piel, nos hacen pensar que probablemente el papel de NuMA en la orientación del huso sea de gran importancia para que este fenómeno ocurra, pudiendo concluir, que al menos en parte, las células de la epidermis se renuevan mediante divisiones asimétricas. Es necesaria una profundización en estos estudios usando los modelos generados en este trabajo para poder asegurar que esto sea así.

La diversidad existente en el sistema nervioso central se debe a la existencia de progenitores neuronales que llevan a cabo diversos modos de divisiones, simétricas y asimétricas para mantener el número de células progenitoras y para producir células diferenciadas como neuronas y células gliales (Huttner and Kosodo, 2005). Los progenitores del sistema nervioso central de *Drosophila* se han usado como modelo para comprender el proceso de división asimétrica, generación de las distintas líneas neuronales y más recientemente la biología de las células madre en vertebrados (Gonzalez, 2007).

Si se compara la biología celular de las divisiones asimétricas de los progenitores neuronales entre *Drosophila* y mamíferos, encontramos bastantes similitudes. Como por ejemplo el hecho de que el plano de división es perpendicular, o

al menos distinto, al eje de polaridad donde se localizan las proteínas que determinan el destino celular y que resulta en una división asimétrica. También se encuentran conservadas muchas proteínas clave para este tipo de divisiones, que contribuyen a la organización polarizada de las células progenitoras y que también presentan una distribución polarizada entre ellas. Sin embargo, existen algunas diferencias importantes entre ambos. Entre ellas se incluye la ausencia en mamíferos del proceso de delaminación y la necesidad de rotación del plano de división 90° para cambiar de división simétrica o proliferativa a división asimétrica o generadora de neuronas. Por lo tanto, el mayor reto sería el poder entender, a un nivel mecanístico de biología celular, cómo los productos de los genes que poseen papeles importantes en el control de la proliferación de los progenitores *versus* diferenciación, llegan a expresarse de manera distinta entre las células progenitoras y cómo pueden ejecutar su función.

Se sabe que los mutantes de Mud (homólogo de NuMA en *Drosophila*) son viables pero presentan, entre otros, defectos en el cerebro (Guan et al., 2000; Prokop and Technau, 1994; Yu et al., 2000). Mud tiene tres isoformas, la más larga contiene una secuencia conservada evolutivamente que también se encuentra en NuMA (Prokop and Technau, 1994), además existe otra secuencia de 30 aminoácidos que también está conservada (Siller et al., 2006). Si a esto, le añadimos el hecho de que Mud (*Drosophila*), Lin5 (*C. elegans*) y NuMA (mamíferos), interaccionan con Pins (*Drosophila*), GPR1/2 (*C. elegans*) y LGN (mamíferos) (Du et al., 2002; Gotta et al., 2003; Srinivasan et al., 2003), podemos pensar que NuMA en mamíferos, podría tener un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso central.

También se ha propuesto que la orientación del huso regula el proceso de neurogénesis y determina el destino celular y la evolución del tamaño del cerebro en mamífero, aunque otros trabajos, en cambio, sugieren que la orientación del huso no tiene un efecto demasiado importante en estos procesos. Se han propuesto varios modelos para explicar cómo las células progenitoras del sistema nervioso de mamíferos se dividen de manera asimétrica. El primero propone una segregación asimétrica de los determinantes del destino celular de manera apical/basal. Es decir si son heredadas por la célula hija apical, dará lugar a un tipo de célula distinto a la célula hija basal. El segundo propone que un pequeño dominio apical puede ser heredado de manera asimétrica, incluso en los casos en los que se produzca una ligera desviación oblicua del plano de división vertical. Por último, otro modelo propone que la fibra basal se mantiene durante la mitosis y es heredada por una única célula hija (revisado en (Knoblich, 2008)).

Según nuestros resultados, obtenidos tras analizar cortes histológicos de embriones y animales hipomórficos para NuMA, podemos resumir que a nivel embrionario, se observa una ligera disminución en el número de motoneuronas y una

desorganización en su localización y que en ratones adultos existe un incremento en el número de células progenitoras del sistema nervioso (inmunohistoquímicas para Sox2 y Sox9), además de una disfunción en el comportamiento de los mismos (estudio de aprendizaje). Por lo tanto, aunque aún no está claro cuál es la manera por la cuál las células progenitoras neuronales se dividen de manera asimétrica, parece que el papel de NuMA en la orientación del huso mitótico está afectando la neurogénesis de ratón. Podremos sacar una conclusión más clara una vez tengamos analizados los ratones en los cuales NuMA está ausente específicamente en el sistema nervioso. Dichos ratones están en estos momentos en cruce (Nestin-Cre x *NuMA*^{lox/lox}). Así mismo, la delección condicional de NuMA en células posmitóticas (e.g. neuronas diferenciadas) podría discriminar el efecto de NuMA en la función de los microtúbulos de su función específica en la formación del huso mitótico en las divisiones celulares.

6. CONCLUSIONES

1. La mutación de Cdk6 R31C no tiene un efecto dramático en la proliferación celular de fibroblastos en cultivo. Tampoco interfiere en el proceso de immortalización de los fibroblastos de acuerdo con la poca relevancia sugerida para esta proteína en este tipo celular.
2. La mutación Cdk6 R31C no provoca defectos relevantes en el desarrollo y los ratones Cdk6 R31C son viables y nacen según la proporción mendeliana esperada.
3. La presencia de la mutación Cdk6 R31C provoca defectivos proliferativos y de maduración en linfocitos resultando en el desarrollo de linfomas de células indiferenciadas en animales adultos.
4. La combinación de las mutaciones Cdk6 R31C y Cdk4 R24C provoca una letalidad embrionaria tardía, probablemente debida a problemas de diferenciación hematopoyética y en concreto a problemas en la maduración de la línea eritroide debido a la falta de actividad de los inhibidores INK4.
5. NuMA es esencial para el desarrollo embrionario y su ausencia provoca letalidad embrionaria temprana, a día 6,5 de desarrollo embrionario.
6. La ausencia de NuMA en fibroblastos en cultivo tiene un efecto dramático en la progresión de las células en el ciclo celular, produciéndose un retraso en la entrada en mitosis, con defectos en la formación del huso mitótico.
7. La expresión de NuMA parece ser necesaria para la correcta formación de diversos tejidos como la piel o el tejido nervioso y para la correcta proliferación de progenitores en esos tejidos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrieu, A., Kahana, J.A., Wood, K.W. and Cleveland, D.W. (2000) CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell*, **102**, 817-826.
- Adams, R.R., Wheatley, S.P., Gouldsworthy, A.M., Kandels-Lewis, S.E., Carmena, M., Smythe, C., Gerloff, D.L. and Earnshaw, W.C. (2000) INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol*, **10**, 1075-1078.
- Alcock, J., Lowe, J., England, T., Bath, P. and Sottile, V. (2009) Expression of Sox1, Sox2 and Sox9 is maintained in adult human cerebellar cortex. *Neurosci Lett*, **450**, 114-116.
- Andersen, S.S., Ashford, A.J., Tournebize, R., Gavet, O., Sobel, A., Hyman, A.A. and Karsenti, E. (1997) Mitotic chromatin regulates phosphorylation of Stathmin/Op18. *Nature*, **389**, 640-643.
- Arnaud, L., Pines, J. and Nigg, E.A. (1998) GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes. *Chromosoma*, **107**, 424-429.
- Bagui, T.K., Mohapatra, S., Haura, E. and Pledger, W.J. (2003) P27Kip1 and p21Cip1 are not required for the formation of active D cyclin-cdk4 complexes. *Mol Cell Biol*, **23**, 7285-7290.
- Basu, J., Bousbaa, H., Logarinho, E., Li, Z., Williams, B.C., Lopes, C., Sunkel, C.E. and Goldberg, M.L. (1999) Mutations in the essential spindle checkpoint gene bub1 cause chromosome missegregation and fail to block apoptosis in Drosophila. *J Cell Biol*, **146**, 13-28.
- Bevins, R.A. and Besheer, J. (2006) Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc*, **1**, 1306-1311.
- Blanpain, C., Horsley, V. and Fuchs, E. (2007) Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell*, **128**, 445-458.
- Bowman, S.K., Neumuller, R.A., Novatchkova, M., Du, Q. and Knoblich, J.A. (2006) The Drosophila NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev Cell*, **10**, 731-742.
- Brito-Babapulle, V., Gruszka-Westwood, A.M., Platt, G., Andersen, C.L., Elnenaei, M.O., Matutes, E., Wotherspoon, A.C., Weston-Smith, S.G. and Catovsky, D. (2002) Translocation t(2;7)(p12;q21-22) with dysregulation of the CDK6 gene mapping to 7q21-22 in a non-Hodgkin's lymphoma with leukemia. *Haematologica*, **87**, 357-362.
- Brooks, W. M., C. A. Stidley, et al. (2000). "Metabolic and cognitive response to human traumatic brain injury: a quantitative proton magnetic resonance study." *J Neurotrauma* **17**(8): 629-40.

- Burke, D.J. (2000) Complexity in the spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 26-31.
- Byrne, C., Tainsky, M. and Fuchs, E. (1994) Programming gene expression in developing epidermis. *Development*, **120**, 2369-2383.
- Campos-Ortega, J.A. (1993) Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol*, **24**, 1305-1327.
- Cassimeris, L. (2002). "The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers." *Curr Opin Cell Biol* **14**(1): 18-24.
- Cavazzini, F., Hernandez, J.A., Gozzetti, A., Russo Rossi, A., De Angeli, C., Tiseo, R., Bardi, A., Tammiso, E., Crupi, R., Lenoci, M.P., Forconi, F., Lauria, F., Marasca, R., Maffei, R., Torelli, G., Gonzalez, M., Martin-Jimenez, P., Maria Hernandez, J., Rigolin, G.M. and Cuneo, A. (2008) Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol*, **142**, 529-537.
- Cayouette, M., Barres, B.A. and Raff, M. (2003) Importance of intrinsic mechanisms in cell fate decisions in the developing rat retina. *Neuron*, **40**, 897-904.
- Cayouette, M. and Raff, M. (2003) The orientation of cell division influences cell-fate choice in the developing mammalian retina. *Development*, **130**, 2329-2339.
- Chan, G.K., Jablonski, S.A., Sudakin, V., Hittle, J.C. and Yen, T.J. (1999) Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol*, **146**, 941-954.
- Chatzimeletiou, K., Morrison, E.E., Prapas, N., Prapas, Y. and Handyside, A.H. (2008) The centrosome and early embryogenesis: clinical insights. *Reprod Biomed Online*, **16**, 485-491.
- Chilosi, M., Doglioni, C., Yan, Z., Lestani, M., Menestrina, F., Sorio, C., Benedetti, A., Vinante, F., Pizzolo, G. and Inghirami, G. (1998) Differential expression of cyclin-dependent kinase 6 in cortical thymocytes and T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemia. *Am J Pathol*, **152**, 209-217.
- Choe, K.S., Radparvar, F., Matushansky, I., Rekhtman, N., Han, X. and Skoultschi, A.I. (2003) Reversal of tumorigenicity and the block to differentiation in erythroleukemia cells by GATA-1. *Cancer Res*, **63**, 6363-6369.
- Clarke, A. R., E. R. Maandag, et al. (1992). "Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development." *Nature* **359**(6393): 328-30.
- Compton, D.A. (1998) Focusing on spindle poles. *J Cell Sci*, **111 (Pt 11)**, 1477-1481.
- Costello, J.F., Plass, C., Arap, W., Chapman, V.M., Held, W.A., Berger, M.S., Su Huang, H.J. and Cavenne, W.K. (1997) Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6)

- amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res*, **57**, 1250-1254.
- Della Ragione, F., Borriello, A., Mastropietro, S., Della Pietra, V., Monno, F., Gabutti, V., Locatelli, F., Bonsi, L., Bagnara, G.P. and Iolascon, A. (1997) Expression of G1-phase cell cycle genes during hematopoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*, **231**, 73-76.
- Desai, A. and Mitchison, T.J. (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 83-117.
- Di Santo, J.P., Radtke, F. and Rodewald, H.R. (2000) To be or not to be a pro-T? *Curr Opin Immunol*, **12**, 159-165.
- Doe, C.Q. and Technau, G.M. (1993) Identification and cell lineage of individual neural precursors in the Drosophila CNS. *Trends Neurosci*, **16**, 510-514.
- Draviam, V.M., Xie, S. and Sorger, P.K. (2004) Chromosome segregation and genomic stability. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 120-125.
- Du, Q., Taylor, L., Compton, D.A. and Macara, I.G. (2002) LGN blocks the ability of NuMA to bind and stabilize microtubules. A mechanism for mitotic spindle assembly regulation. *Curr Biol*, **12**, 1928-1933.
- Dubois, N.C., Hofmann, D., Kaloulis, K., Bishop, J.M. and Trumpp, A. (2006) Nestin-Cre transgenic mouse line Nes-Cre1 mediates highly efficient Cre/loxP mediated recombination in the nervous system, kidney, and somite-derived tissues. *Genesis*, **44**, 355-360.
- Durcan, T. M., E. S. Halpin, et al. (2008). "Tektin 2 is required for central spindle microtubule organization and the completion of cytokinesis." *J Cell Biol* **181**(4): 595-603.
- Easton, J., Wei, T., Lahti, J.M. and Kidd, V.J. (1998) Disruption of the cyclin D/cyclin-dependent kinase/INK4/retinoblastoma protein regulatory pathway in human neuroblastoma. *Cancer Res*, **58**, 2624-2632.
- Ennaceur, A. and Delacour, J. (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*, **31**, 47-59.
- Ericson, K.K., Krull, D., Slomiany, P. and Grossel, M.J. (2003) Expression of cyclin-dependent kinase 6, but not cyclin-dependent kinase 4, alters morphology of cultured mouse astrocytes. *Mol Cancer Res*, **1**, 654-664.
- Foad, B. S., L. E. Adams, et al. (1974). "Phytomitogen responses of peripheral blood lymphocytes in young and older subjects." *Clin Exp Immunol* **17**(4): 657-64.
- Foulds, L. (1954) The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res*, **14**, 327-339.

- Friedrich, G. and Soriano, P. (1991) Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev*, **5**, 1513-1523.
- Fujimoto, T., Anderson, K., Jacobsen, S.E., Nishikawa, S.I. and Nerlov, C. (2007) Cdk6 blocks myeloid differentiation by interfering with Runx1 DNA binding and Runx1-C/EBPalpha interaction. *Embo J*, **26**, 2361-2370.
- Gaglio, T., Dionne, M.A. and Compton, D.A. (1997) Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. *J Cell Biol*, **138**, 1055-1066.
- Gaglio, T., Saredi, A. and Compton, D.A. (1995) NuMA is required for the organization of microtubules into aster-like mitotic arrays. *J Cell Biol*, **131**, 693-708.
- Gallicchio, L., K. Visvanathan, et al. (2007). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of developing breast cancer in a population-based prospective cohort study in Washington County, MD." *Int J Cancer* **121**(1): 211-15.
- Gardner, M. K., D. J. Odde, et al. (2008). "Kinesin-8 molecular motors: putting the brakes on chromosome oscillations." *Trends Cell Biol* **18**(7): 307-10.
- Gil, J. and Peters, G. (2006) Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 667-677.
- Gilbert, T. and Merlet-Benichou, C. (2000) Retinoids and nephron mass control. *Pediatr Nephrol*, **14**, 1137-1144.
- Golsteyn, R. M., H. A. Lane, et al. (1996). "The family of polo-like kinases." *Prog Cell Cycle Res* **2**: 107-14.
- Gonzalez, C. (2007) Spindle orientation, asymmetric division and tumour suppression in Drosophila stem cells. *Nat Rev Genet*, **8**, 462-472.
- Gorbsky, G.J. (1997) Cell cycle checkpoints: arresting progress in mitosis. *Bioessays*, **19**, 193-197.
- Gordon, M.B., Howard, L. and Compton, D.A. (2001) Chromosome movement in mitosis requires microtubule anchorage at spindle poles. *J Cell Biol*, **152**, 425-434.
- Goshima, G., Mayer, M., Zhang, N., Stuurman, N. and Vale, R.D. (2008) Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J Cell Biol*, **181**, 421-429.
- Goshima, G., F. Nedelec, et al. (2005). "Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins." *J Cell Biol* **171**(2): 229-40.
- Gotta, M., Dong, Y., Peterson, Y.K., Lanier, S.M. and Ahringer, J. (2003) Asymmetrically distributed C. elegans homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Curr Biol*, **13**, 1029-1037.

- Gotz, M. and Huttner, W.B. (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 777-788.
- Grossel, M. J., G. L. Baker, et al. (1999). "cdk6 can shorten G(1) phase dependent upon the N-terminal INK4 interaction domain." *J Biol Chem* **274**(42): 29960-7.
- Guan, Z., Prado, A., Melzig, J., Heisenberg, M., Nash, H.A. and Raabe, T. (2000) Mushroom body defect, a gene involved in the control of neuroblast proliferation in *Drosophila*, encodes a coiled-coil protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8122-8127.
- Gusella, J., Geller, R., Clarke, B., Weeks, V. and Housman, D. (1976) Commitment to erythroid differentiation by friend erythroleukemia cells: a stochastic analysis. *Cell*, **9**, 221-229.
- Hanada, T., L. Lin, et al. (2000). "GAKIN, a novel kinesin-like protein associates with the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor in T lymphocytes." *J Biol Chem* **275**(37): 28774-84.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A. and Dean, D.C. (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, **98**, 859-869.
- Hardwick, K.G. (1998) The spindle checkpoint. *Trends Genet*, **14**, 1-4.
- Hartwell, L.H. and Weinert, T.A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, **246**, 629-634.
- Hata, S., M. Nanae, et al. (2007). "Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy." *Dev Growth Differ* **49**(2): 163-70.
- Hayette, S., Tigaud, I., Callet-Bauchu, E., Ffrench, M., Gazzo, S., Wahbi, K., Callanan, M., Felman, P., Dumontet, C., Magaud, J.P. and Rimokh, R. (2003) In B-cell chronic lymphocytic leukemias, 7q21 translocations lead to overexpression of the CDK6 gene. *Blood*, **102**, 1549-1550.
- Heald, R., Tournebise, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A. and Karsenti, E. (1996) Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature*, **382**, 420-425.
- Heald, R., Tournebise, R., Habermann, A., Karsenti, E. and Hyman, A. (1997) Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J Cell Biol*, **138**, 615-628.
- Hochegger, H., S. Takeda, et al. (2008). "Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(11): 910-6.
- Hogan, B.L., Blessing, M., Winnier, G.E., Suzuki, N. and Jones, C.M. (1994) Growth factors in development: the role of TGF-beta related polypeptide signalling molecules in embryogenesis. *Dev Suppl*, 53-60.

- Hori, Y., E. H. Perkins, et al. (1973). "Decline in phytohemagglutinin responsiveness of spleen cells from aging mice." *Proc Soc Exp Biol Med* **144**(1): 48-53.
- Hoyt, M.A. (2000) Exit from mitosis: spindle pole power. *Cell*, **102**, 267-270.
- Hsieh, F.F., Barnett, L.A., Green, W.F., Freedman, K., Matushansky, I., Skoultschi, A.I. and Kelley, L.L. (2000) Cell cycle exit during terminal erythroid differentiation is associated with accumulation of p27(Kip1) and inactivation of cdk2 kinase. *Blood*, **96**, 2746-2754.
- Hu, M.G., Deshpande, A., Enos, M., Mao, D., Hinds, E.A., Hu, G.F., Chang, R., Guo, Z., Dose, M., Mao, C., Tschlis, P.N., Gounari, F. and Hinds, P.W. (2009) A requirement for cyclin-dependent kinase 6 in thymocyte development and tumorigenesis. *Cancer Res*, **69**, 810-818.
- Hung, C. Y., E. H. Perkins, et al. (1975). "Age-related refractoriness of PHA-induced lymphocyte transformation. II. 125-I-PHA binding to spleen cells from young and old mice." *Mech Ageing Dev* **4**(2): 103-12.
- Huttner, W.B. and Kosodo, Y. (2005) Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 648-657.
- Indra, A. K., M. Li, et al. (2000). "Targeted somatic mutagenesis in mouse epidermis." *Horm Res* **54**(5-6): 296-300.
- Ito, K., A. Hirao, et al. (2004). "Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells." *Nature* **431**(7011): 997-1002.
- Izumi, Y., Ohta, N., Hisata, K., Raabe, T. and Matsuzaki, F. (2006) Drosophila Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat Cell Biol*, **8**, 586-593.
- Jacks, T., A. Fazeli, et al. (1992). "Effects of an Rb mutation in the mouse." *Nature* **359**(6393): 295-300.
- Jang, C. Y., J. Wong, et al. (2008). "DDA3 recruits microtubule depolymerase Kif2a to spindle poles and controls spindle dynamics and mitotic chromosome movement." *J Cell Biol* **181**(2): 255-67.
- Johansen, K. M. and J. Johansen (2007). "Cell and molecular biology of the spindle matrix." *Int Rev Cytol* **263**: 155-206.
- Joncourt, F., F. Bettens, et al. (1981). "Age-related changes of mitogen responsiveness in different lymphoid organs from outbred NMRI mice." *Immunobiology* **158**(5): 439-49.
- Kastan, M.B. and Bartek, J. (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, **432**, 316-323.

- Khatib, Z.A., Matsushime, H., Valentine, M., Shapiro, D.N., Sherr, C.J. and Look, A.T. (1993) Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. *Cancer Res*, **53**, 5535-5541.
- Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B.R. and Rieder, C.L. (2000) Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol*, **10**, 59-67.
- Khodjakov, A., Copenagle, L., Gordon, M.B., Compton, D.A. and Kapoor, T.M. (2003) Minus-end capture of preformed kinetochore fibers contributes to spindle morphogenesis. *J Cell Biol*, **160**, 671-683.
- Kiyokawa, H., Richon, V.M., Rifkind, R.A. and Marks, P.A. (1994) Suppression of cyclin-dependent kinase 4 during induced differentiation of erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol*, **14**, 7195-7203.
- Kline-Smith, S.L. and Walczak, C.E. (2004) Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. *Mol Cell*, **15**, 317-327.
- Knoblich, J.A. (2008) Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*, **132**, 583-597.
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T. and Matsuzaki, F. (2008) Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat Cell Biol*, **10**, 93-101.
- Krimpenfort, P., Ijpenberg, A., Song, J.Y., van der Valk, M., Nawijn, M., Zevenhoven, J. and Berns, A. (2007) p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. *Nature*, **448**, 943-946.
- Landis, M.W., Pawlyk, B.S., Li, T., Sicinski, P. and Hinds, P.W. (2006) Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell*, **9**, 13-22.
- Lane, H.A. and Nigg, E.A. (1996) Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol*, **135**, 1701-1713.
- Lapointe, J., Lachance, Y., Labrie, Y. and Labrie, C. (1996) A p18 mutant defective in CDK6 binding in human breast cancer cells. *Cancer Res*, **56**, 4586-4589.
- Latres, E., Malumbres, M., Sotillo, R., Martin, J., Ortega, S., Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Cordon-Cardo, C. and Barbacid, M. (2000) Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *Embo J*, **19**, 3496-3506.
- Lechler, T. and Fuchs, E. (2005) Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature*, **437**, 275-280.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B. and McKay, R.D. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, **60**, 585-595.

- Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1997) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, **386**, 623-627.
- Lloyd, R.V., Erickson, L.A., Jin, L., Kulig, E., Qian, X., Cheville, J.C. and Scheithauer, B.W. (1999) p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol*, **154**, 313-323.
- Lundberg, A.S. and Weinberg, R.A. (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*, **18**, 753-761.
- Lyczak, R., Gomes, J.E. and Bowerman, B. (2002) Heads or tails: cell polarity and axis formation in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *Dev Cell*, **3**, 157-166.
- Mahoney, N.M., Goshima, G., Douglass, A.D. and Vale, R.D. (2006) Making microtubules and mitotic spindles in cells without functional centrosomes. *Curr Biol*, **16**, 564-569.
- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J. and Lukas, J. (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*, **288**, 1425-1429.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*, **1**, 222-231.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*, **30**, 630-641.
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P. and Barbacid, M. (2004) Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell*, **118**, 493-504.
- Manning, A. L. and D. A. Compton (2008). "Structural and regulatory roles of nonmotor spindle proteins." *Curr Opin Cell Biol* **20**(1): 101-6.
- Martin, A., Odajima, J., Hunt, S.L., Dubus, P., Ortega, S., Malumbres, M. and Barbacid, M. (2005) Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer Cell*, **7**, 591-598.
- Marzo, N., C. Mora, et al. (2004). "Pancreatic islets from cyclin-dependent kinase 4/R24C (Cdk4) knockin mice have significantly increased beta cell mass and are physiologically functional, indicating that Cdk4 is a potential target for pancreatic beta cell mass regeneration in Type 1 diabetes." *Diabetologia* **47**(4): 686-94.
- Marzo, N., S. Ortega, et al. (2008). "Cyclin-dependent kinase 4 hyperactivity promotes autoreactivity in the immune system but protects pancreatic cell mass from autoimmune destruction in the nonobese diabetic mouse model." *J Immunol* **180**(2): 1189-98.
- Massague, J. (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, **432**, 298-306.

- Matushansky, I., F. Radparvar, et al. (2000). "Manipulating the onset of cell cycle withdrawal in differentiated erythroid cells with cyclin-dependent kinases and inhibitors." *Blood* **96**(8): 2755-64.
- Matushansky, I., F. Radparvar, et al. (2000). "Reprogramming leukemic cells to terminal differentiation by inhibiting specific cyclin-dependent kinases in G1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14317-22.
- Matushansky, I., F. Radparvar, et al. (2003). "CDK6 blocks differentiation: coupling cell proliferation to the block to differentiation in leukemic cells." *Oncogene* **22**(27): 4143-9.
- Mazumdar, M. and T. Misteli (2005). "Chromokinesins: multitasking players in mitosis." *Trends Cell Biol* **15**(7): 349-55.
- McIntosh, J.R., Grishchuk, E.L. and West, R.R. (2002) Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **18**, 193-219.
- McLin, V. A. and A. M. Zorn (2006). "Molecular control of liver development." *Clin Liver Dis* **10**(1): 1-25, v.
- Mendrzyk, F., Radlwimmer, B., Joos, S., Kokocinski, F., Benner, A., Stange, D.E., Neben, K., Fiegler, H., Carter, N.P., Reifemberger, G., Korshunov, A. and Lichter, P. (2005) Genomic and protein expression profiling identifies CDK6 as novel independent prognostic marker in medulloblastoma. *J Clin Oncol*, **23**, 8853-8862.
- Merdes, A., Heald, R., Samejima, K., Earnshaw, W.C. and Cleveland, D.W. (2000) Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *J Cell Biol*, **149**, 851-862.
- Merdes, A., Ramyar, K., Vechio, J.D. and Cleveland, D.W. (1996) A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell*, **87**, 447-458.
- Mijimolle, N., Velasco, J., Dubus, P., Guerra, C., Weinbaum, C.A., Casey, P.J., Campuzano, V. and Barbacid, M. (2005) Protein farnesyltransferase in embryogenesis, adult homeostasis, and tumor development. *Cancer Cell*, **7**, 313-324.
- Mitchison, T. J., P. Maddox, et al. (2005). "Roles of polymerization dynamics, opposed motors, and a tensile element in governing the length of *Xenopus* extract meiotic spindles." *Mol Biol Cell* **16**(6): 3064-76.
- Moore, C. A. and R. A. Milligan (2006). "Lucky 13-microtubule depolymerisation by kinesin-13 motors." *J Cell Sci* **119**(Pt 19): 3905-13.
- Moreau-Gachelin, F., A. Tavittian, et al. (1988). "Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias." *Nature* **331**(6153): 277-80.

- Morin, X., Jaouen, F. and Durbec, P. (2007) Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nat Neurosci*, **10**, 1440-1448.
- Musacchio, A. and Salmon, E.D. (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 379-393.
- Nagel, S., E. Leich, et al. (2008). "Amplification at 7q22 targets cyclin-dependent kinase 6 in T-cell lymphoma." *Leukemia* **22**(2): 387-92.
- Nicklas, R.B. (1997) How cells get the right chromosomes. *Science*, **275**, 632-637.
- Nigg, E.A. (1996) Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 312-317.
- Nigg, E.A. (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 21-32.
- Norbury, C. and Nurse, P. (1992) Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem*, **61**, 441-470.
- Nowell, P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**, 23-28.
- Ogasawara, T., Katagiri, M., Yamamoto, A., Hoshi, K., Takato, T., Nakamura, K., Tanaka, S., Okayama, H. and Kawaguchi, H. (2004) Osteoclast differentiation by RANKL requires NF-kappaB-mediated downregulation of cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res*, **19**, 1128-1136.
- Okamoto, I., Pirker, C., Bilban, M., Berger, W., Losert, D., Marosi, C., Haas, O.A., Wolff, K. and Pehamberger, H. (2005) Seven novel and stable translocations associated with oncogenic gene expression in malignant melanoma. *Neoplasia*, **7**, 303-311.
- Ortega, S., Malumbres, M. and Barbacid, M. (2002) Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1602**, 73-87.
- Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martin, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J.L., Malumbres, M. and Barbacid, M. (2003) Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet*, **35**, 25-31.
- Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K. and Barrandon, Y. (2001) Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*, **104**, 233-245.
- Pardee, A.B. (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 1286-1290.
- Parmentier, M.L., Woods, D., Greig, S., Phan, P.G., Radovic, A., Bryant, P. and O'Kane, C.J. (2000) Rapsynoid/partner of inscuteable controls asymmetric division of larval neuroblasts in *Drosophila*. *J Neurosci*, **20**, RC84.

- Pavletich, N.P. (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk2s, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol*, **287**, 821-828.
- Pevny, L. and Placzek, M. (2005) SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol*, **15**, 7-13.
- Philipp-Staheli, J., Payne, S.R. and Kemp, C.J. (2001) p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res*, **264**, 148-168.
- Poon, R.Y. and Hunter, T. (1995) Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science*, **270**, 90-93.
- Porter, P.L., Malone, K.E., Heagerty, P.J., Alexander, G.M., Gatti, L.A., Firpo, E.J., Daling, J.R. and Roberts, J.M. (1997) Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med*, **3**, 222-225.
- Prokop, A. and Technau, G.M. (1994) Normal function of the mushroom body defect gene of Drosophila is required for the regulation of the number and proliferation of neuroblasts. *Dev Biol*, **161**, 321-337.
- Putkey, F.R., Cramer, T., Morpew, M.K., Silk, A.D., Johnson, R.S., McIntosh, J.R. and Cleveland, D.W. (2002) Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev Cell*, **3**, 351-365.
- Rajagopalan, H. and Lengauer, C. (2004) Aneuploidy and cancer. *Nature*, **432**, 338-341.
- Ramsey, M.R., Krishnamurthy, J., Pei, X.H., Torrice, C., Lin, W., Carrasco, D.R., Ligon, K.L., Xiong, Y. and Sharpless, N.E. (2007) Expression of p16Ink4a compensates for p18Ink4c loss in cyclin-dependent kinase 4/6-dependent tumors and tissues. *Cancer Res*, **67**, 4732-4741.
- Ranade, K., Hussussian, C.J., Sikorski, R.S., Varmus, H.E., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., Serrano, M., Hannon, G.J., Beach, D. and Dracopoli, N.C. (1995) Mutations associated with familial melanoma impair p16INK4 function. *Nat Genet*, **10**, 114-116.
- Rane, S.G., Dubus, P., Mettus, R.V., Galbreath, E.J., Boden, G., Reddy, E.P. and Barbacid, M. (1999) Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet*, **22**, 44-52.
- Reifenberger, G., Reifenberger, J., Ichimura, K., Meltzer, P.S. and Collins, V.P. (1994) Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res*, **54**, 4299-4303.

- Richard, P., Gaudon, K., Haddad, H., Ammar, A.B., Genin, E., Bauche, S., Paturneau-Jouas, M., Muller, J.S., Lochmuller, H., Grid, D., Hamri, A., Nouioua, S., Tazir, M., Mayer, M., Desnuelle, C., Barois, A., Chabrol, B., Pouget, J., Koenig, J., Gouider-Khouja, N., Hentati, F., Eymard, B. and Hantai, D. (2008) The CHRNE 1293insG founder mutation is a frequent cause of congenital myasthenia in North Africa. *Neurology*, **71**, 1967-1972.
- Rieder, C.L. and Salmon, E.D. (1994) Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle. *J Cell Biol*, **124**, 223-233.
- Rieder, C.L. and Salmon, E.D. (1998) The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol*, **8**, 310-318.
- Rittling, S.R. (1996) Clonal nature of spontaneously immortalized 3T3 cells. *Exp Cell Res*, **229**, 7-13.
- Ruano, Y., Mollejo, M., Ribalta, T., Fiano, C., Camacho, F.I., Gomez, E., de Lope, A.R., Hernandez-Moneo, J.L., Martinez, P. and Melendez, B. (2006) Identification of novel candidate target genes in amplicons of Glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling. *Mol Cancer*, **5**, 39.
- Ruas, M. and Peters, G. (1998) The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*, **1378**, F115-177.
- Ruchaud, S., M. Carmena, et al. (2007). "Chromosomal passengers: conducting cell division." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10): 798-812.
- Ruiz-Llorente, S., Montero-Conde, C., Milne, R.L., Moya, C.M., Cebrian, A., Leton, R., Cascon, A., Mercadillo, F., Landa, I., Borrego, S., Perez de Nanclares, G., Alvarez-Escola, C., Diaz-Perez, J.A., Carracedo, A., Urioste, M., Gonzalez-Neira, A., Benitez, J., Santisteban, P., Dopazo, J., Ponder, B.A. and Robledo, M. (2007) Association study of 69 genes in the ret pathway identifies low-penetrance loci in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res*, **67**, 9561-9567.
- Russell, P. (1998) Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem Sci*, **23**, 399-402.
- Samuelson, E., Levan, K., Adamovic, T., Levan, G. and Horvath, G. (2008) Recurrent gene amplifications in human type I endometrial adenocarcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, **181**, 25-30.
- Sanchez, Y., Desany, B.A., Jones, W.J., Liu, Q., Wang, B. and Elledge, S.J. (1996) Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science*, **271**, 357-360.

- Santamaria, A., Nagel, S., Sillje, H.H. and Nigg, E.A. (2008) The spindle protein CHICA mediates localization of the chromokinesin Kid to the mitotic spindle. *Curr Biol*, **18**, 723-729.
- Santamaria, D., Barriere, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Caceres, J.F., Dubus, P., Malumbres, M. and Barbacid, M. (2007) Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, **448**, 811-815.
- Schaefer, M., Petronczki, M., Dorner, D., Forte, M. and Knoblich, J.A. (2001) Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Cell*, **107**, 183-194.
- Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A. and Knoblich, J.A. (2000) A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr Biol*, **10**, 353-362.
- Scholey, J.M., Brust-Mascher, I. and Mogilner, A. (2003) Cell division. *Nature*, **422**, 746-752.
- Schwenk, F., Baron, U. and Rajewsky, K. (1995) A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res*, **23**, 5080-5081.
- Scolnick, D.M. and Halazonetis, T.D. (2000) Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature*, **406**, 430-435.
- Shapiro, G.I. (2006) Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol*, **24**, 1770-1783.
- Shapiro, P.S., Vaisberg, E., Hunt, A.J., Tolwinski, N.S., Whalen, A.M., McIntosh, J.R. and Ahn, N.G. (1998) Activation of the MKK/ERK pathway during somatic cell mitosis: direct interactions of active ERK with kinetochores and regulation of the mitotic 3F3/2 phosphoantigen. *J Cell Biol*, **142**, 1533-1545.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501-1512.
- Sicinska, E., Aifantis, I., Le Cam, L., Swat, W., Borowski, C., Yu, Q., Ferrando, A.A., Levin, S.D., Geng, Y., von Boehmer, H. and Sicinski, P. (2003) Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell*, **4**, 451-461.
- Sicinski, P., Donaher, J.L., Geng, Y., Parker, S.B., Gardner, H., Park, M.Y., Robker, R.L., Richards, J.S., McGinnis, L.K., Biggers, J.D., Eppig, J.J., Bronson, R.T., Elledge, S.J. and Weinberg, R.A. (1996) Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature*, **384**, 470-474.
- Siegrist, S. E. and C. Q. Doe (2005). "Microtubule-induced Pins/Galphai cortical polarity in *Drosophila* neuroblasts." *Cell* **123**(7): 1323-35.

- Silk, A.D., Holland, A.J. and Cleveland, D.W. (2009) Requirements for NuMA in maintenance and establishment of mammalian spindle poles. *J Cell Biol*, **184**, 677-690.
- Siller, K.H., Cabernard, C. and Doe, C.Q. (2006) The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat Cell Biol*, **8**, 594-600.
- Siller, K.H. and Doe, C.Q. (2008) Lis1/dynactin regulates metaphase spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Dev Biol*, **319**, 1-9.
- Siller, K.H. and Doe, C.Q. (2009) Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol*, **11**, 365-374.
- Siller, K.H., Serr, M., Steward, R., Hays, T.S. and Doe, C.Q. (2005) Live imaging of *Drosophila* brain neuroblasts reveals a role for Lis1/dynactin in spindle assembly and mitotic checkpoint control. *Mol Biol Cell*, **16**, 5127-5140.
- Skarnes, W.C., von Melchner, H., Wurst, W., Hicks, G., Nord, A.S., Cox, T., Young, S.G., Ruiz, P., Soriano, P., Tessier-Lavigne, M., Conklin, B.R., Stanford, W.L. and Rossant, J. (2004) A public gene trap resource for mouse functional genomics. *Nat Genet*, **36**, 543-544.
- Smart, I.H. (1970) Variation in the plane of cell cleavage during the process of stratification in the mouse epidermis. *Br J Dermatol*, **82**, 276-282.
- Sotillo, R., Dubus, P., Martin, J., de la Cueva, E., Ortega, S., Malumbres, M. and Barbacid, M. (2001a) Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors. *Embo J*, **20**, 6637-6647.
- Sotillo, R., Garcia, J.F., Ortega, S., Martin, J., Dubus, P., Barbacid, M. and Malumbres, M. (2001b) Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13312-13317.
- Srinivasan, D.G., Fisk, R.M., Xu, H. and van den Heuvel, S. (2003) A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signaling and spindle function in *C elegans*. *Genes Dev*, **17**, 1225-1239.
- Steitz, J., Buchs, S., Tormo, D., Ferrer, A., Wenzel, J., Huber, C., Wolfel, T., Barbacid, M., Malumbres, M. and Tuting, T. (2006) Evaluation of genetic melanoma vaccines in cdk4-mutant mice provides evidence for immunological tolerance against autochthonous melanomas in the skin. *Int J Cancer*, **118**, 373-380.
- Su, X.Y., Busson, M., Della Valle, V., Ballerini, P., Dastugue, N., Talmant, P., Ferrando, A.A., Baudry-Bluteau, D., Romana, S., Berger, R. and Bernard, O.A. (2004) Various types of rearrangements target TLX3 locus in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, **41**, 243-249.

- Sugimoto, M., Martin, N., Wilks, D.P., Tamai, K., Huot, T.J., Pantoja, C., Okumura, K., Serrano, M. and Hara, E. (2002) Activation of cyclin D1-kinase in murine fibroblasts lacking both p21(Cip1) and p27(Kip1). *Oncogene*, **21**, 8067-8074.
- Suijkerbuijk, S.J. and Kops, G.J. (2008) Preventing aneuploidy: the contribution of mitotic checkpoint proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1786**, 24-31.
- Sumpio, B.E., Chang, R., Xu, W.J., Wang, X.J. and Du, W. (1997) Regulation of tPA in endothelial cells exposed to cyclic strain: role of CRE, AP-2, and SSRE binding sites. *Am J Physiol*, **273**, C1441-1448.
- Tanaka, T. U. and A. Desai (2008). "Kinetochore-microtubule interactions: the means to the end." *Curr Opin Cell Biol* **20**(1): 53-63.
- Taylor, S.S. and McKeon, F. (1997) Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell*, **89**, 727-735.
- Tice, R. R., E. L. Schneider, et al. (1979). "Cytokinetic analysis of the impaired proliferative response of peripheral lymphocytes from aged humans to phytohemagglutinin." *J Exp Med* **149**(5): 1029-41.
- Thirumangalathu, S., D. E. Harlow, et al. (2009). "Fate mapping of mammalian embryonic taste bud progenitors." *Development* **136**(9): 1519-28.
- Todaro, G.J. and Green, H. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*, **17**, 299-313.
- Tsutsui, T., Hesabi, B., Moons, D.S., Pandolfi, P.P., Hansel, K.S., Koff, A. and Kiyokawa, H. (1999) Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity. *Mol Cell Biol*, **19**, 7011-7019.
- Tybulewicz, V. L., C. E. Crawford, et al. (1991). "Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene." *Cell* **65**(7): 1153-63.
- van Dekken, H., van Marion, R., Vissers, K.J., Hop, W.C., Dinjens, W.N., Tilanus, H.W., Wink, J.C. and van Duin, M. (2008) Molecular dissection of the chromosome band 7q21 amplicon in gastroesophageal junction adenocarcinomas identifies cyclin-dependent kinase 6 at both genomic and protein expression levels. *Genes Chromosomes Cancer*, **47**, 649-656.
- Varga, V., J. Helenius, et al. (2006). "Yeast kinesin-8 depolymerizes microtubules in a length-dependent manner." *Nat Cell Biol* **8**(9): 957-62.
- Vasioukhin, V., Degenstein, L., Wise, B. and Fuchs, E. (1999) The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8551-8556.

- Vassar, R., Rosenberg, M., Ross, S., Tyner, A. and Fuchs, E. (1989) Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 1563-1567.
- Walczak, C. E. and R. Heald (2008). "Mechanisms of mitotic spindle assembly and function." *Int Rev Cytol* **265**: 111-58.
- Walczak, C. E., I. Vernos, et al. (1998). "A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity." *Curr Biol* **8**(16): 903-13.
- Walters, C. S. and H. N. Claman (1975). "Age-related changes in cell-mediated immunity in BALB/C mice." *J Immunol* **115**(5): 1438-43.
- Wang, X., Zinkel, S., Polonsky, K. and Fuchs, E. (1997) Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: prospects for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 219-226.
- Wianny, F., Tavares, A., Evans, M.J., Glover, D.M. and Zernicka-Goetz, M. (1998) Mouse polo-like kinase 1 associates with the acentriolar spindle poles, meiotic chromosomes and spindle midzone during oocyte maturation. *Chromosoma*, **107**, 430-439.
- Wolfel, T., M. Hauer, et al. (1995). "A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma." *Science* **269**(5228): 1281-4.
- Wolpaw, J.R. and Tennissen, A.M. (2001) Activity-dependent spinal cord plasticity in health and disease. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 807-843.
- Yang, J. and Kornbluth, S. (1999) All aboard the cyclin train: subcellular trafficking of cyclins and their CDK partners. *Trends Cell Biol*, **9**, 207-210.
- Yao, X., Abrieu, A., Zheng, Y., Sullivan, K.F. and Cleveland, D.W. (2000) CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat Cell Biol*, **2**, 484-491.
- Yoshimura, S., Takagi, Y., Harada, J., Teramoto, T., Thomas, S.S., Waeber, C., Bakowska, J.C., Breakefield, X.O. and Moskowitz, M.A. (2001) FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5874-5879.
- Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X. and Chia, W. (2000) Analysis of partner of inscuteable, a novel player of Drosophila asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell*, **100**, 399-409.
- Yuan, Y., Shen, H., Franklin, D.S., Scadden, D.T. and Cheng, T. (2004) In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat Cell Biol*, **6**, 436-442.
- Zecevic, M., Catling, A.D., Eblen, S.T., Renzi, L., Hittle, J.C., Yen, T.J., Gorbsky, G.J. and Weber, M.J. (1998) Active MAP kinase in mitosis: localization at

- kinetochores and association with the motor protein CENP-E. *J Cell Biol*, **142**, 1547-1558.
- Zhang, D., G. C. Rogers, et al. (2007). "Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes." *J Cell Biol* **177**(2): 231-42.
- Zigman, M., Cayouette, M., Charalambous, C., Schleiffer, A., Hoeller, O., Dunican, D., McCudden, C.R., Firnberg, N., Barres, B.A., Siderovski, D.P. and Knoblich, J.A. (2005) Mammalian inscuteable regulates spindle orientation and cell fate in the developing retina. *Neuron*, **48**, 539-545.
- Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., Walker, G.J., Hayward, N. and Dracopoli, N.C. (1996) Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet*, **12**, 97-99.

ANEXO

CDK4/6 inhibition by INK4 proteins modulates age-dependent proliferation and maturation in hematopoietic cells

Esther Rodríguez,¹ Victor Quereda,¹ Marta Cañamero,² Pierre Dubus³ and Marcos Malumbres^{1*}

¹ Cell Division and Cancer Group, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid. ² Comparative Pathology Unit, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid, ³ EA2406 University of Bordeaux 2, Bordeaux, France.

Correspondence: M. Malumbres, Cell Division and Cancer Group, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) Madrid. Melchor Fernández almagro 3, E-28029 Madrid, Spain. Tel. +34 91 732 8000; Fax +34 91 732 8033. E-mail: malumbres@cnio.es

Abstract

Cdk4 and Cdk6 kinases regulate the entry into the cell cycle in response to the appropriate stimuli. Their activity is inhibited by INK4 proteins, p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} and p19^{INK4d}, which are induced in response to antimitogenic signals. To test the relevance of this inhibitory mechanism *in vivo* we have generated knock in mice that carry a mutation (Arg31 by Cys) that renders a Cdk6 protein insensitive to inhibition by INK4 proteins. *Cdk6*^{R31C/R31C} mice display an increased number of DN4 immature lymphocytes suggesting a central role of Cdk6-INK4 regulatory modules in the proliferative burst at the DN3-DN4 transition. *Cdk6*^{R31C/R31C} T-lymphocytes display increased proliferation and these mutant mice develop aggressive lymphomas formed of immature lymphocytes with age. The combination of *Cdk4*^{R24C} and *Cdk6*^{R31C} alleles in homozygosity results in lethality in late embryonic development. *Cdk4*^{R24C/R24C}; *Cdk6*^{R31C/R31C} embryos display hypoplastic fetal livers by embryonic day (E)16.5 in which several hematopoietic lineages are altered. In particular, there is an increased in nucleated and immature erythroblasts suggesting that INK4 inhibitors modulate erythroid differentiation by inhibiting Cdk4 and Cdk6 during embryonic development.

Introduction

Cyclin-dependent kinases (Cdks) regulate multiple cellular processes including cell cycle progression, transcription or neuron biology (Malumbres and Barbacid, 2005). Among cell cycle Cdks, Cdk4 and Cdk6 are two highly-

related kinases (~70% homology) that phosphorylate retinoblastoma protein (pRB) family members and regulate progression through G1 to regulate DNA replication (S-phase). Both Cdk4 and Cdk6 are activated by D-type cyclins (D1, D2 and D3) which are mostly induced by mitogenic signals leading to Cdk4/6 activation and pRB phosphorylation in response to mitogenic signalling. Cdk-dependent phosphorylation of pRB ultimately results in its inactivation and the subsequent transcriptional induction of several genes required for S-phase or mitosis (Malumbres and Barbacid, 2001).

Cdk4 and Cdk6 are thought to be partially redundant in regulating G1 transition in cultured cells. *In vivo*, lack of either of these kinases results in specific defects in a cell-type specific manner. Thus, Cdk4 deficiency results in defective proliferation of postnatal pancreatic beta cells and pituitary cells (Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999) whereas lack of Cdk6 provokes specific defects in hematopoietic cells (Hu et al., 2009; Malumbres et al., 2004). These two proteins compensate each other in specific tissues as concomitant ablation of both Cdk4 and Cdk6 results in embryonic lethality due to defective erythropoiesis (Malumbres et al., 2004). Further compensatory roles by other members of the Cdk family, i.e. Cdk2 or Cdk1, have also been identified. Thus, in the absence of Cdk4/6, Cdk2 may be able to bind D-type cyclins (Malumbres et al., 2004). Finally, Cdk1 may also efficiently bind D-type cyclins in the absence of Cdk4, Cdk6 and Cdk2 (Santamaria et al., 2007) suggesting that all these cell cycle kinases may participate in the G1/S transition. The relative functional requirements for each of these kinases suggests that the Cdk family has evolved to support controlled proliferation of the multiple cell types in mammals (Malumbres and Barbacid, 2009).